

**Genotypisierung von
Varicella-Zoster-Viren in Deutschland**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Reinhard Hild,

geboren am 22.09.1982 in Erfurt

Gutachter

1. Prof. Dr. med. habil. A. Sauerbrei, Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. PD Dr. med. habil. B. Gruhn, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. med. habil. H. Zeichhardt, Charité – Campus Benjamin Franklin, Institut für Virologie

Tag der öffentlichen Verteidigung : 06.07.2009

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom
AE	Elutionspuffer bei DNA-Präparation
AS	Aminosäure
AW1	Waschpuffer 1
AW2	Waschpuffer 2
BglII	Restriktionsendonuklease BglII
bidest.	Doppelt destilliert
Bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	Circa
CD	Cluster of differentiation
CMV	Humanes Zytomegalievirus
cpE	Zytopathischer Effekt
Da	Dalton
DEPC-H ₂ O	Mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
dest.	Destilliert
DGKJ	Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
E	Early
EB	Elutionspuffer bei Gelextraktion
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EM	Elektronenmikroskop
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Und Mitarbeiter
ER	Endoplasmatisches Retikulum
e.V.	Eingetragener Verein
F	Forward
ff.	Folgende
G	Guanin
x g	x Erdbeschleunigung
g	Glykoprotein
h	Stunde
HELF	Humane embryonale Lungenfibroblasten
HHV	Humanes Herpesvirus
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HSV-1	Herpes-simplex-Virus Typ 1
HSV-2	Herpes-simplex-Virus Typ 2
IE	Immediate Early
Ig	Immunglobulin
IR _L	Intermediate Repeat Long
IR _S	Intermediate Repeat Short
i.v.	Intravenös
IU	International Unit
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Late
l	Liter

m	Männlich
M	Mol
Man-6-P	Mannose-6-Phosphat
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
min	Minute
µg	Microgramm
µl	Microliter
n.a.	Nicht analysiert
n.b.	Nicht bekannt
NCR	Non Coding Region
Nr.	Nummer
Nt	Nukleotid
ORF	Open Reading Frame
ORI	Origin of Replication
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE-Puffer	Reinigungspuffer
pM	Picomol
pOka	Parental Oka
POP6	Performance Optimized Polymer 6
PstI	Restriktionsendonuklease <i>PstI</i>
PZN	Postzosterische Neuralgie
QG-Puffer	Lösungspuffer
R	Reverse
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat

sec	Sekunde
SmaI	Restriktionsendonuklease <i>SmaI</i>
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STIKO	Ständige Impfkommission am Robert Koch-Institut
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Bor-EDTA
TE	Tris-EDTA
TR _L	Terminal Repeat Long
TR _S	Terminal Repeat Short
T-Lymphozyt	Thymus-abhängiger Lymphozyt
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U _L	Unique Long
U _S	Unique Short
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
vOka	Vaccine Oka
VZV	Varicella-Zoster-Virus
W	Weiblich
WHO	World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Historie des Varicella-Zoster-Virus	3
2.2 Klassifizierung der humanen Herpesviren.....	4
2.3 Pathogenese der Varicella-Zoster-Virus-Infektion	5
2.4 Epidemiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie der Varicella-Zoster-Virus-Erkrankungen.....	6
2.5 Impfschutz gegen Varizellen.....	11
2.6 Molekularbiologie des Varicella-Zoster-Virus.....	13
2.6.1 Morphologie.....	13
2.6.2 Genomorganisation des Varicella-Zoster-Virus.....	13
2.6.3 Lytischer Zyklus der Varicella-Zoster-Virus-Partikel	15
2.6.4 Molekulare Charakterisierung des Varicella-Zoster-Virus.....	16
2.7 Zielstellung	19
3 Materialien und Methoden	20
3.1 Materialien.....	20
3.1.1 Patienten.....	20
3.1.2 Untersuchungsmaterialien der Patienten.....	21
3.1.3 Virusreferenzstämme.....	21
3.1.4 Oligonukleotidprimer.....	22
3.1.5 Verwendete Chemikalien.....	23
3.1.6 Agarosegele.....	25
3.1.7 Eingesetzte Kitsysteme	26
3.1.8 Geräte und technische Hilfsmittel.....	27
3.2 Methoden.....	28
3.2.1 Zellkulturpassagierung	28
3.2.2 Virusanzucht.....	28
3.2.3 DNA-Präparation.....	28
3.2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten	29
3.2.5 Agarosegelelektrophorese	31
3.2.6 Restriktionsenzymverdau.....	32
3.2.7 Aufreinigung der Amplifikate mittels Gelextraktion	33

3.2.8 Sequenzierung der DNA-Fragmente.....	34
3.2.9 Analyse der Sequenzrohdaten.....	36
3.2.10 Statistische Analyse.....	37
4 Ergebnisse	38
4.1 Anzucht des Varicella-Zoster-Virus.....	38
4.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	38
4.3 Amplifikation und Restriktionsenzymanalyse des Open Reading Frame 62	40
4.4 Sequenzierung und Genotypisierung	40
4.4.1 Analyse der Open Reading Frames	40
4.4.2 Single Nucleotide Polymorphisms.....	41
4.4.3 Genotypen des Varicella-Zoster-Virus.....	45
4.4.4 Zuordnung der Varicella-Zoster-Virus-Genotypen zur klinischen Diagnose	52
4.4.5 Statistische Auswertung der Genotypisierungsergebnisse.....	54
5 Diskussion	55
5.1 Notwendigkeit einer Surveillance zirkulierender Varicella-Zoster-Virus-Genotypen	55
5.2 Genotypisierungsmethoden verschiedener Arbeitsgruppen im Vergleich.....	56
5.3 Genotypen des Varizella-Zoster-Virus in Deutschland.....	62
5.4 Analyse der Genotypen des Varicella-Zoster-Virus in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf.....	70
5.5 Genotypen des Varicella-Zoster-Virus in Deutschland im internationalen Vergleich.....	71
6 Schlußfolgerungen.....	76
7 Literaturverzeichnis	78
8 Anhang	87
8.1 Tabellarischer Anhang	87
8.2 Statistische Berechnungen	100
8.3 Lebenslauf	102
8.4 Danksagung.....	103
8.5 Ehrenwörtliche Erklärung.....	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung (Abb.) mit Nummer und Beschriftung	Seite
<i>Abb. 1: Bild typischer Varizellen</i>	<i>7</i>
<i>Abb. 2: Unilaterales Bläschenexanthem bei Zoster-Erkrankung.....</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 3: Schematische Darstellung des VZV.....</i>	<i>13</i>
<i>Abb. 4: Elektronenoptische Darstellung des VZV.....</i>	<i>13</i>
<i>Abb. 5: Agarosegelelektrophorese nach Amplifikation von VZV-DNA-Fragmenten.....</i>	<i>32</i>
<i>Abb. 6: Agarosegelelektrophorese nach Restriktionsenzymverdau mit SmaI</i>	<i>33</i>
<i>Abb. 7: Sequenzierungsstrategie für die Fragmente der VZV-ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60 nach Philipps (2007) ..</i>	<i>35</i>
<i>Abb. 8: Auszug aus den ausgewerteten Sequenzierdaten.....</i>	<i>44</i>
<i>Abb. 9: Zusammenfassung der analysierten VZV-Stämme in einem phylogenetischen Stammbaum unter Einbeziehung der ORF 1, 21, 50 und 54</i>	<i>50</i>
<i>Abb. 10: Zusammenfassung der analysierten VZV-Stämme in einem phylogenetischen Stammbaum unter Einbeziehung der ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60.....</i>	<i>51</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle (Tab.) mit Nummer und Beschriftung	Seite
<i>Tab. 1: Humanpathogene Herpesviren und assoziierte Erkrankungen (Dörries et al. 2005).....</i>	<i>5</i>
<i>Tab. 2: Nomenklatur mittels verschiedener VZV-Genotypisierungsmethoden.....</i>	<i>18</i>
<i>Tab. 3: Übersicht über die einbezogenen Untersuchungsmaterialien</i>	<i>21</i>
<i>Tab. 4: Virusreferenzstämme</i>	<i>22</i>
<i>Tab. 5: Charakteristika der verwendeten Oligonukleotidprimer</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 6: Chemikalien, fertig gelieferte Puffer, Enzyme und Medien</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 7: Puffer und Medienrezepturen</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 8: Rezeptur der Agarosegele.....</i>	<i>26</i>
<i>Tab. 9: Eingesetzte Kitsysteme.....</i>	<i>26</i>
<i>Tab. 10: Geräte und Hilfsmittel</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 11: PCR-Reaktionsmixture zur Amplifizierung der ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60.....</i>	<i>30</i>
<i>Tab. 12: Kinetik der Fragment-PCR.....</i>	<i>30</i>
<i>Tab. 13: Reaktionsmix zur Herstellung eines Fragmentes aus ORF 62</i>	<i>31</i>
<i>Tab. 14: Kinetik der PCR für das Fragment von ORF 62.....</i>	<i>31</i>
<i>Tab. 15: Reaktionsmix für die Sequenzier-PCR.....</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 16: Kinetik der Sequenzier-PCR.....</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 17 : Ergebnisse der Virusanzucht</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 18: Ergebnisse der Amplifikation der ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60.....</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 19: Sequenzierung der DNA-Fragmente aus den ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60.....</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 20: VZV-Genotypen und Subgenotypen bei Patienten mit Varizellen oder Zoster</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 21: Zuordnung der VZV-Genotypen zur klinischen Diagnose</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 22 : Verteilung der VZV-Genotypen bei den Patienten mit Varizellen und Zoster</i>	<i>54</i>
<i>Tab. 23: RFLP von VZV-Stämmen (Sauerbrei und Wutzler 2007b)</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 24: Vergleich verschiedener Verfahren zur Genotypisierung des VZV</i>	<i>60</i>
<i>Tab. 25: Genotypisierungsergebnisse im internationalen Vergleich bei Patienten mit Varizellen.....</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 26 : Genotypisierungsergebnisse im internationalen Vergleich bei Patienten mit Zoster.....</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 27: Genotypisierungsergebnisse im internationalen Vergleich bei Patienten mit Varizellen oder Zoster ...</i>	<i>75</i>
<i>Tab. 28: Daten der einbezogenen Patienten mit Varizellen.....</i>	<i>87</i>
<i>Tab. 29: Daten der einbezogenen Patienten mit Zoster bei jeweils regelhaftem Verlauf</i>	<i>90</i>
<i>Tab. 30: Übersicht über die genetischen Polymorphismen der einbezogenen VZV-Stämme von Patienten mit Varizellen</i>	<i>91</i>
<i>Tab. 31 : Übersicht über die genetischen Polymorphismen der einbezogenen VZV-Stämme von Patienten mit Zoster.....</i>	<i>97</i>

1 Zusammenfassung

Das Varicella-Zoster-Virus (VZV) gehört zur Gruppe der humanpathogenen Herpesviren. Es zählt zu den weltweit am häufigsten vorkommenden Viren. Die Primärinfektion mit dem VZV führt zu den typischerweise im Kleinkindalter auftretenden Varizellen (Windpocken). Die Folge ist die Etablierung einer lebenslangen Latenz des Virus in Nervenganglien. Eine von dort ausgehende endogene Reinfektion zieht meist im Alter einen Zoster (Gürtelrose) nach sich. Die hohen Inzidenzraten und die zum Teil erhebliche Krankheitslast bei Varizellen resultierten in einer allgemeinen Impfempfehlung im Jahre 2004. Eine Impfempfehlung zur Prophylaxe des Zoster wird gegenwärtig erwartet. Die Einführung dieser Impfungen auf der Basis von Lebendimpfstoffen macht eine molekularbiologische Surveillance der zirkulierenden VZV-Stämme notwendig. Von einer solchen Überwachung muss eine sichere Unterscheidung von Wild- und Impftyp-Viren gefordert werden. Außerdem ist es sinnvoll, zwischen verschiedenen VZV-Genotypen zu unterscheiden, um auch Varianten oder Rekombinanten sicher abgrenzen zu können. Methodisch kommen dafür die Analyse der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) bestimmter Genomabschnitte sowie der Nachweis von Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) mittels DNA-Sequenzierung in Betracht. Bislang beschäftigten sich mehrere internationale Arbeitsgruppen mit der Genotypisierung von VZV-Stämmen, was zu verschiedenen Klassifikationssystemen geführt hat. Das Ziel der Promotionsarbeit war es, aktuelle VZV-Stämme von Patienten mit Varizellen und Patienten mit Zoster unter Einsatz der genannten Methoden zu genotypisieren, um Rückschlüsse auf die in Deutschland zirkulierenden Genotypen ziehen zu können.

In die vorliegende Studie wurden 96 VZV-Stämme von Patienten mit Varizellen und 34 von Zoster vorwiegend aus den Jahren 2003 bis 2007 einbezogen. Alle Patientenproben stammten aus Praxen und Kliniken in den Thüringer Städten Erfurt, Jena und Weimar. Die Kultivierung in humanen embryonalen Lungenfibroblasten (HELFI) gelang bei 13 Proben von Varizellen und bei neun Proben von Zoster. In diesen Fällen wurden die Isolate niedriger Zellkulturpassagen für die molekularbiologischen Untersuchungen verwendet. Bei den übrigen 108 Proben erfolgte der Einsatz der Originalmaterialien. Alle VZV-Stämme sollten zunächst zur Unterscheidung von Wild- und Impftyp-Viren mittels RFLP-Analyse eines DNA-Fragments des ORF 62 charakterisiert werden. Es folgte die Amplifikation und Sequenzierung von DNA-Fragmenten der Open Reading Frames (ORF) 1, 21, 37, 50, 54 und 60. Die dazu erforderlichen Oligonukleotidprimer wurden auf der Basis des europäischen

Referenzstammes *Dumas* erstellt. In Auswertung der Sequenzierdaten erfolgte ein Vergleich mit den Referenzstämmen *Dumas* und parental Oka (*pOka*) und schließlich die Klassifizierung auf der Basis der durch Barrett-Muir et al. (2003) eingeführten Nomenklatur.

Im Ergebnis der vorliegenden Arbeit gelang die Restriktionsenzymanalyse bei 74 von 96 Varizellen-Stämmen und bei 25 von 34 Zoster-Stämmen. Alle 99 VZV-Stämme ließen sich als Wildtypen charakterisieren. Die genetische Charakterisierung der Fragmente aller sechs gewählten ORF mittels Sequenzierung wurde bei 76 Proben von Patienten mit Varizellen und bei 30 von Patienten mit Zoster durchgeführt. Bei weiteren 20 VZV-Stämmen erfolgte eine Charakterisierung zumindest der ORF 1, 21, 50 und 54. Von diesen stammten 19 von Varizellen und eine Probe von Zoster. Von den 96 VZV-Stämmen der Patienten mit Varizellen ließen sich 54 als Genotyp B und jeweils 20 als Genotypen A und C bestimmen. Unter den untersuchten Varizellen-Stämmen wurden elf Subgenotypen nachgewiesen. Dabei wurden zwei VZV-Stämme dem Subgenotyp C4, drei dem Subgenotyp C5 und einer dem Subgenotyp C7 zugeordnet. Innerhalb der VZV-Stämme des Genotyps B ließ sich jeweils ein Stamm als Subgenotyp B1, B3, B4 bzw. B5 klassifizieren. Unter den 20 VZV-Stämmen des Genotyps A entfielen 13 auf den Subgenotyp A1, vier auf A3, einer auf A4 und zwei auf A5. Bei zwei VZV-Stämmen von Varizellen handelte es sich um potentielle A/B/C- bzw. B/C-Rekombinanten, deren genaue Charakterisierung nur mit Ganzgenomanalyse möglich ist. Die 34 VZV-Stämme der Zoster-Patienten verteilten sich zu gleichen Teilen auf die Genotypen B und C. Insgesamt konnten fünf Varianten dokumentiert werden. Bei Genotyp C-Stämmen fanden sich ein Vertreter des Subgenotyps C2 und drei Vertreter von C6. Unter den Genotyp B-Stämmen der Zoster-Patienten wurde jeweils ein Stamm als Variante B1, B2 bzw. B6 bestimmt. Bemerkenswert ist, dass kein Typ A-Stamm als Zostererreger nachgewiesen werden konnte.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass es derzeit zumindest in der einbezogenen Region des Freistaates Thüringen zu einer Verschiebung des Genotyp-Musters zirkulierender VZV-Stämme zu Gunsten des Genotyps A kommt. Die häufigsten aktuell zirkulierenden VZV-Stämme gehören mit 56% zum Genotyp B, gefolgt von Stämmen des Genotyps C und A mit jeweils 21%. Die Genotypisierung von VZV-Stämmen aus den Originalmaterialien von Patienten mit Varizellen oder Zoster gelingt nicht immer zufriedenstellend. Deshalb ist als Methode der Wahl die Genotypisierung von VZV-Stämmen nach Virusanzucht zu empfehlen. Die eingesetzte Scattered-ORF-Methode gestattet eine zuverlässige Genotypisierung, wobei mit einem vertretbaren Arbeitsaufwand auch zahlreiche Subgenotypen und mögliche Rekombinanten erfasst werden können.

2 Einleitung

2.1 Historie des Varicella-Zoster-Virus

Die Windpocken (Varizellen) als Erkrankung sind bereits seit dem Mittelalter bekannt. Der Name Windpocken ist dabei durchaus treffend, da der Erreger aerogen übertragen werden kann (Quinlivan und Breuer 2006). Die Entstehung der Varizellen durch die Übertragung eines infektiösen Agens wurde zuerst 1875 von Steiner bestätigt (Modrow 2003). Unna fasste 1894 die Erreger der Gürtelrose (Zoster), des Herpes genitalis und Herpes febrilis in der Herpesgruppe zusammen. Im Jahre 1909 vermutete Bokay enge Beziehungen zwischen Varizellen und Zoster, nachdem beide Erkrankungen bis dahin als eigenständig galten. Dieses Postulat konnte 1925 von Kundraditz in einem ethisch fragwürdigen Experiment bestätigt werden. Nach experimenteller Übertragung des infektiösen Inhalts aus Zosterbläschen auf gesunde Kinder kam es zum Auftreten von Windpocken. Dies war der Beweis dafür, dass beide Erkrankungen durch das gleiche Virus ausgelöst werden. Eine elektronenmikroskopische Darstellung des als Varicella-Zoster-Virus (VZV) bezeichneten Erregers gelang erstmals Ruska im Jahre 1943 (Modrow 2003, Hlinak 1974). Die Amerikaner Weller und Stoddard züchteten 1952 das VZV zum ersten Mal in der Zellkultur an (Weller et al. 1958). Im Jahre 1974 wurde in Japan der erste VZV-Impfstamm weltweit entwickelt (Takahashi et al. 1974). Zehn Jahre später wurde durch Restriktionsenzymanalyse bewiesen, dass dem Zoster eine endogene Reaktivierung des nach dem Auftreten von Varizellen latent im Organismus verbleibenden VZV zugrunde liegt (Straus et al. 1984). Es folgte 1986 die Sequenzierung eines kompletten VZV-Stammes (Davison und Scott 1986). Der in die Untersuchung einbezogene Virusstamm *Dumas* gilt seither als Prototyp der in Europa vorkommenden VZV-Stämme. In den letzten Jahren haben sich zahlreiche internationale Forschergruppen mit der genotypischen Charakterisierung des VZV beschäftigt.

2.2 Klassifizierung der humanen Herpesviren

Die humanen Herpesviren (HHV) zeichnen sich durch eine Reihe gemeinsamer Merkmale aus. Sie verfügen über eine doppelsträngige DNA mit einer Länge von 124-235 Kilobasen (kb). Das umgebende Kapsid ist ikosaedrisch aufgebaut und wird vom Tegument sowie der Virushülle umgeben. Die Größe der HHV reicht von 150-200 nm.

Taxonomisch wird die Familie der Herpesviridae in die Subfamilien Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae eingeteilt (siehe Tab. 1). Der Subfamilie der Alphaherpesvirinae werden das Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2) sowie das VZV zugerechnet. HSV-1 ist der Erreger des Herpes labialis und anderer Infektionen vorwiegend im Gesichts- und Kopfbereich wie Gingivostomatitis herpetica, Keratokonjunktivitis herpetica oder der Herpes-Enzephalitis (Dörries et al. 2005). Die Seroprävalenz von HSV-1 in Form von Antikörpern betrug in Deutschland im Jahr 1998 mehr als 88% (Wutzler et al. 2000). HSV-2 ist vorwiegend für Infektionen im Genitalbereich verantwortlich. Antikörper können bei 15% der Frauen und bei 10,5% der Männer nachgewiesen werden (Wutzler et al. 2000). Beiden Viren ist gemeinsam, dass sie nach der Infektion latent in den Ganglienzellen sensorischer Nerven verbleiben. Verschiedene endogene oder exogene Stimuli können einen erneuten Replikationszyklus mit typischen Haut- und Schleimhauterscheinungen auslösen.

Auf das VZV, das ebenfalls zur Subfamilie der Alphaherpesvirinae gehört und im Vordergrund der vorliegenden Arbeit steht, wird in den nachfolgenden Kapiteln ausführlich eingegangen.

Zu den Betaherpesvirinae gehören das humane Zytomegalievirus (CMV) sowie die Humanen Herpesviren 6 (HHV-6) und 7 (HHV-7). Die Primärinfektion mit dem CMV führt zur zytomegalen Einschlusskörperchenkrankheit in den Speicheldrüsen bzw. gelegentlich zur CMV-Mononukleose (Köhler 2001). Im Alter von 40 Jahren sind bis zu 90% der Erwachsenen seropositiv (de Ory et al. 2004). Das CMV verbleibt latent in mononukleären Zellen des Blutes. Bei immunsupprimierten Personen können endogene CMV-Reaktivierungen zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Darüber hinaus ist das CMV der häufigste Erreger pränataler Infektionen und kann schwere Fehlbildungen mit geistigen und körperlichen Syndromen verursachen (Wiersbitzky et al. 1993). HHV-6 verursacht das Exanthema subitum bzw. Dreitagefieber mit kurzzeitigem Exanthem, Fieber und Lymphknotenschwellung, während klinisch manifeste Infektionen durch das HHV-7 vermutlich sehr selten sind (Dörries et al. 2005).

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) der Subfamilie der Gammaherpesvirinae ist der Erreger der infektiösen Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber). Darüber hinaus ist das EBV an der Entstehung des Burkitt-Lymphoms, des Nasopharyngealkarzinoms und an lymphoproliferativen Erkrankungen unter Immunsuppression beteiligt (de The 1997, Gruhn et al. 2003). Die Durchseuchung im Erwachsenenalter wird mit 90% angegeben (Dörries et al. 2005). HHV-8 zählt ebenfalls zu den Gammaherpesvirinae. Es wird mit dem Entstehen des Kaposi-Sarkoms im Vollbild des Acquired Immune Deficiency Syndrom (AIDS) in Verbindung gebracht (Dörries et al. 2005). Eine Übersicht über die Taxonomie der Herpesvirus-Familie und die wichtigsten Erkrankungen zeigt die Tab. 1.

Tab. 1: Humanpathogene Herpesviren und assoziierte Erkrankungen (Dörries et al. 2005)

Subfamilie	Genus	Spezies	Erkrankung
Alphaherpesvirinae	Simplexvirus	Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)	Herpes labialis
		Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HSV-2)	Herpes genitalis
	Varicellovirus	Varicella-Zoster-Virus (VZV)	Varizellen (Windpocken) Zoster (Gürtelrose)
Betaherpesvirinae	Cytomegalievirus	Humanes Zytomegalievirus (CMV)	CMV-Infektion
	Roseolovirus	Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6) Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)	Exanthema subitum Symptomlose Infektion
Gammaherpesvirinae	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr-Virus (EBV)	Infektiöse Mononukleose
	Rhadinovirus	Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8)	Kaposi-Sarkom

2.3 Pathogenese der Varicella-Zoster-Virus-Infektion

Das VZV wird aerogen und durch engen Kontakt mit infizierten Personen übertragen. Typische Eintrittsorte für den Erreger sind die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes sowie in seltenen Fällen die des Genitalbereichs (Birch et al. 2003). Es gelangt von dort weiter zu den regionalen Lymphknoten, in denen die primäre Replikation stattfindet. Diese führt zur ersten virämischen Phase 4-6 Tage nach Infektion, in der eine Besiedlung von Leber und Milz stattfindet. In deren Folge findet eine Infektion von mononukleären und Cluster of differentiation (CD) 4- sowie CD8-positiven Thymus-abhängigen (T-)Lymphozyten am Gefäßendothel der Leberzellen statt. In der sich anschließenden zweiten Virämie 10–14 Tage nach Infektion breitet sich das Virus mit den CD4-positiven Zellen mukokutan bis in die

Epidermis aus (Gray 2003, Moffat et al. 1995, Ku et al. 2002). Dieser Prozess führt zu zytopathischen Effekten (cpE), die erste Hautläsionen zur Folge haben. Später kommt es zur Immigration von mononukleären Zellen und zur Auslösung der Entzündungsreaktion. Die Exsudation führt zum Abheben der Epidermis von den Basalzellen. Daraus resultiert eine Bildung von Bläschen, die anfangs nur Viren, später auch Makrophagen und Lymphozyten enthalten. Im Verlauf der Infektion kommen die Viren durch direkte Zell-zu-Zell-Kontakte oder hämatogen mit den Nervenendigungen in Kontakt. Sie wandern in die sensorischen Ganglien des Rückenmarks und etablieren dort die Latenz. Eine nichtentzündliche Infektion der dorsalen Ganglien ist auch direkt durch T-Lymphozyten möglich (Hufner et al. 2006, Zerboni et al. 2005). Während der Latenz findet keine Virusreplikation statt. Jedoch wurden Transkripte der ORF 4, 18, 21, 29, 62 und 63 von Hood et al. (2006) nachgewiesen. Translationsprodukte ließen sich nur von den Leserahmen 4, 21, 29, 62 und 63 nachweisen. Die Arbeitsgruppe fand auch heraus, dass das Translationsprodukt von IE 63 die Apoptose der Nervenzellen inhibiert (Hood et al. 2006).

Jahre oder Jahrzehnte nach der Etablierung der Viruslatenz kann es zur Virusreaktivierung und nachfolgend zum Zoster kommen. Auslösende Faktoren können Traumata, Immundepression durch höheres Alter oder Immunsuppression durch therapeutische Eingriffe, Transplantationen oder andere Ursachen sein. Die Reaktivierung führt zum retrograden axonalen Transport vom dorsalen Ganglion in das versorgte Dermatom. Dort kommt es zur Virusvermehrung und zur Bläschenbildung. Eine Nekrose der Nervenendigungen mit neuralgischem Zosterschmerz und postzosterischer Neuralgie (PZN) ist möglich.

2.4 Epidemiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie der Varicella-Zoster-Virus-Erkrankungen

- Varizellen

Der an Varizellen bzw. Zoster erkrankte Mensch stellt die einzige Infektionsquelle für Varizellen dar. Diese Erkrankung gehörte mit 750.000 Fällen pro Jahr bis zur Einführung der allgemeinen Impfempfehlung im Jahre 2004 zu den häufigsten impfpräventablen Krankheiten in Deutschland. Von diesen fallen 310.000 Erkrankungen in das Alter von 0 bis 5 Jahren, 320.000 in das Alter von 6 bis 12 Jahren und 65.000 in die Gruppe der 12 bis 15-Jährigen.

Die Durchseuchung von 4 bis 5-jährigen Kindern mit dem VZV liegt bei 62,5%, die von 10 bis 11-Jährigen bei 94%. Nach dem 40. Lebensjahr sind nur noch Einzelpersonen seronegativ (STIKO 2004, LaRussa et al. 2000, Wutzler et al. 2001).

Die Übertragung des VZV erfolgt aerogen durch virushaltige Tröpfchen beim Husten sowie durch Hautkontakt mit virushaltigen Bläschen. Nach der Primärinfektion kommt es im Anschluss an eine Inkubationszeit von 10–23 Tagen zum Auftreten eines juckenden Exanthems, das sich vom Kopf in Richtung Rumpf und Extremitäten ausbreitet. Die Extremitäten sind normalerweise weniger stark betroffen. Innerhalb weniger Stunden treten nacheinander rote Flecken, Papeln, Bläschen und Pusteln auf. Während der folgenden Tage kommt es zu mehreren Krankheitsschüben, was zum Auftreten von Effloreszenzen in verschiedenen Entwicklungsstadien nebeneinander führt. Es resultiert das Bild des „Heubnerschen Sternenhimmels“ (Abb. 1). Die Schwere der Erkrankung variiert stark. Neben milden Verläufen mit wenigen Bläschen kann es auch zu solchen mit mehreren hundert Effloreszenzen kommen. Im Laufe der Erkrankung sind vorher gesunde Kinder, sowohl mit als auch ohne Fieber, in der Regel nur leicht im Allgemeinzustand betroffen. Die Abheilung des Exanthems erfolgt meist innerhalb von fünf Tagen (Sitzmann 2007).



Abb. 1: Bild typischer Varizellen

Stammbetontes Exanthem mit Effloreszenzen in verschiedenen Entwicklungsstadien: Flecken, Papeln, Bläschen, Pusteln („Heubnerscher Sternenhimmel“)

Quelle : <http://cache.eb.com/eb/image?id=82674&rendTypeId=4> (01.07.2008)

Bei geimpften Kindern kann es zu sogenannten Durchbruchvarizellen kommen. Dieses Krankheitsbild ist vergleichsweise nur schwach ausgeprägt und durch Wildstämme ausgelöst. Das Impfvirus kann in seltenen Fällen Impfvarizellen oder einen Zoster hervorrufen (Brunell und Argaw 2000, Brunell et al. 1987, Jean-Philippe et al. 2007, LaRussa et al. 2000, Liang et al. 2000, Sauerbrei et al. 2004b, Uebe et al. 2002).

Mit einer Inzidenz von 5,7% treten bei Varizellen Komplikationen und in 16,3% der Fälle schwere Verläufe auf. Es kommt bei 2,7 von 100.000 Kindern zu einer Hospitalisierung mit einer durchschnittlichen Aufenthaltsdauer von fünf Tagen. Die Letalität wird mit 0,4 pro 100.000 erkrankte Kinder angegeben (Wagenpfeil et al. 2004, Wutzler et al. 2002, Grote et al. 2007, DGKJ 2005). Die häufigsten Komplikationen von Varizellen sind neurologische Erkrankungen wie Zerebellitis, Enzephalitis, gelegentlich auch Meningitis mit zum Teil persistierenden Folgeschäden. Weitere Komplikationen sind Superinfektionen der Haut, Arthritis und Osteomyelitis, am häufigsten durch *Streptococcus pyogenes* (Ziebold et al. 2001). Besonders hoch ist die Rate von Komplikationen bei Patienten mit einer Immunsuppression infolge systemischer Kortikoidgabe, vor allem aber bei Kindern mit T-Lymphozytendefekten. Ein schon im Jugendalter auftretender generalisierter Zoster ist unter Umständen nicht von Varizellen zu unterscheiden. Gelegentlich erkranken immunsupprimierte Kinder auch an Zweitvarizellen oder rezidivierenden VZV-Infektionen (Melzi et al. 2006). Die Infektion verläuft bei diesen Kindern schwerer und mit höherer Letalität (Hill et al. 2005). Varzellenerkrankungen im Erwachsenenalter führen häufiger zu Komplikationen, in deren Verlauf vermehrt Pneumonien auftreten. Tödliche Verläufe findet man bei 30- bis 49-Jährigen in 25,2 von 100.000 Fällen (Wutzler 2000). Während der Gravidität ist eine Übertragung des Virus über die Plazenta zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft möglich. Die Inzidenz von Windpocken wird dabei mit 0,1 bis 0,7 pro 1.000 Schwangerschaften angegeben (Sauerbrei 1998). Bei einer Erstinfektion mit VZV kommt es abhängig vom Zeitpunkt der fetalen Entwicklung zu Fruchtschädigungen. Varizellen in den ersten 24 Schwangerschaftswochen können zum fetalen Varzellensyndrom führen. Im Vordergrund stehen Veränderungen der Haut (Narben, Defekte), Erkrankungen der Augen (Katarakt, Chorioretinitis) des ZNS (Hirnatrophie, Paralysen) und Skelettmissbildungen (Grose 1994, Pastuszak et al. 1994, Sauerbrei 1998). In den letzten Schwangerschaftswochen können mütterliche Windpocken zu neonatalen Varizellen führen. Bei mütterlichen Varizellen fünf Tage vor bis zwei Tage nach der Geburt muss bei 30% der Neugeborenen mit lebensbedrohlichen Varizellen gerechnet werden (Sauerbrei und Wutzler 2007a, Wutzler und Sauerbrei 2007).

Im Vordergrund der Labordiagnostik von Varizellen steht der Virusnachweis. Die Methode der Wahl zum Nachweis von VZV-DNA in entsprechenden Effloreszenzen ist die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Puchhammer-Stöckl et al. 1991, Sauerbrei et al. 1999). Alternativen zur virologischen Diagnostik sind der VZV-Antigennachweis und die Erregerisolierung in humanen Zellkulturen (Sauerbrei et al. 1999). Die Serologie dient vorwiegend zur Feststellung des VZV-Immunstatus mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Es erfolgt vorzugsweise der Nachweis von Immunglobulin (Ig) G-Antikörpern gegen VZV-Envelope-Glykoproteine (Sauerbrei und Wutzler 2006). Eine serologische Diagnostik von Varizellen kann mittels Nachweis virusspezifischer IgM-Antikörper durchgeführt werden.

Die Behandlung unkomplizierter Varizelleninfektionen erfolgt lediglich symptomatisch. Bei schweren Verläufen der Erkrankung werden Kinder mit Aciclovir intravenös (i.v.) (3x10-15 mg/kg Körpergewicht (KG) pro Tag über sieben bis zehn Tage) oder in Ausnahmefällen mit Aciclovir oral (4x20 mg/kg KG pro Tag über sieben Tage) behandelt (Breuer 2007). Erwachsene erhalten ebenfalls Aciclovir i.v. (3x10 mg/kg KG pro Tag über fünf bis 20 Tage) oder Aciclovir oral (5x800 mg pro Tag über fünf bis sieben Tage). Bei bakteriellen Superinfektionen kann der Einsatz von Antibiotika erforderlich werden (Sitzmann 2007).

- **Zoster**

Nach der Primärinfektion bleibt das VZV in zentralen und spinalen sensorischen Ganglien latent. Bei bis zu 23% aller seropositiven Personen kommt es nach Virusreaktivierung zum Zoster (Krause und Klinman 2000). Ein erhöhtes Risiko besteht für ältere Personen sowie Patienten mit gestörter Immunabwehr. Die Zoster-Inzidenz liegt bei Kindern und Jugendlichen zwischen 42 und 160 pro 100.000 Personen, wobei intrauterin durchgemachte VZV-Infektionen und Varizellen im ersten Lebensjahr das Risiko eines Zosters erhöhen (Takayama et al. 2000). Bei 40jährigen Erwachsenen liegt die Inzidenz zwischen 200 und 300 pro 100.000 und nach dem 80. Lebensjahr bei >1.000 pro 100.000 Personen (Guess et al. 1985, Gross 1997, Petursson et al. 1998).

Infolge endogener Reaktivierung wandern die VZV-Partikel retrograd vom Ganglion zum Innervationsgebiet. Während des Prodromalstadiums haben die Patienten unspezifische Beeinträchtigungen des Allgemeinzustandes sowie lokalisierte Missempfindungen und brennende Schmerzen. Im Anschluss kommt es zum typischen Krankheitsbild mit Knötchen und einem unilateralen Bläschenexanthem (Abb. 2) im Versorgungsbereich eines peripheren

sensiblen Nerven, oft verbunden mit schweren neuralgischen Schmerzen. In den meisten Fällen ist der Thorax- und Lumbalbereich betroffen. Später trocknen die Bläschen ein, und deren Krusten fallen nach zwei bis drei Wochen ab. Besondere Gefahr droht beim Befall eines Hirnnerven, wobei Auge und Innenohr in Mitleidenschaft gezogen werden können. Komplikationen können bakterielle Superinfektionen und neurologische Symptomkomplexe umfassen. In bis zu 70% der Fälle kann es zur PZN kommen (Dörries et al. 2005, Whitley et al. 1999, Oxman et al. 2005). Dieser Symptomkomplex besteht aus Schmerzen und Missempfindungen in dem Gebiet der Reinfektion von länger als vier Wochen, oder es kommt zum erneuten Auftreten von Symptomen nach einem schmerzfreien Intervall. Eine frühzeitige antivirale Therapie vermag zusätzlich zu einer suffizienten Schmerztherapie sowohl Inzidenz als auch Schwere der PZN zu senken (Oxman et al. 2005). Dazu eignen sich Brivudin oral (1x125 mg pro Tag über sieben Tage), Valaciclovir oral (3x1 g pro Tag über sieben Tage) und Famciclovir oral (3x0,5 g pro Tag für sieben Tage) (Gross 2006, Wassilew 2006). Eine schnelle Labordiagnostik zur Absicherung der Diagnose Zoster ist mittels VZV-PCR möglich (Sauerbrei et al. 1999). Die Serologie ist lediglich für eine retrospektive Diagnostik geeignet. Sie stützt sich auf den Nachweis von VZV-spezifischen IgM-, IgA- und IgG-Antikörpern mittels ELISA oder Immunfluoreszenz (Sauerbrei et al. 2004a, Sauerbrei und Wutzler 2006).



Abb. 2: Unilaterales Bläschenexanthem bei Zoster-Erkrankung

Quelle : <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/images/ency/fullsize/19687.jpg> (01.07.2008)

2.5 Impfschutz gegen Varizellen

Im Jahre 1974 wurde ein japanischer VZV-Wildtyp-Stamm aus dem Bläscheninhalt eines dreijährigen Jungen gewonnen. Dessen Familienname Oka wurde als Bezeichnung für den in Zellkulturen etablierten Virusstamm parental Oka (*pOka*) übernommen. Die Entwicklung eines Impfstammes (vaccine Oka, *vOka*) erfolgte durch Abschwächung von Virulenz und Pathogenität des Virus mittels eines in den 70er Jahren entwickelten Verfahrens mit serienmäßiger Viruspassagierung in humanen embryonalen Fibroblasten und embryonalen Zellkulturen von Meerschweinchen (Takahashi et al. 1985). Das Oka-Impfvirus wird von der World Health Organization (WHO) zur Prophylaxe gegen Varizellen empfohlen und derzeit von vier Firmen hergestellt: Merck und Co Inc (Whitehouse Station, USA), Pasteur Merieux Connaught (Swiftwater, USA), Biken Inc (Japan) und GlaxoSmithKline (Brentford, Großbritannien). Zur Zeit verwendete Impfstoffe sind als Lyophilisate erhältlich und bei Kühlschranktemperatur zu lagern. In Deutschland wurden Impfungen seit 1984 bei Hochrisikopatienten mit Immunsuppression und deren Kontaktpersonen sowie medizinischem Personal durchgeführt. Im Jahr 2004 wurde entsprechend der Empfehlung der Ständigen Impfkommission am Robert Koch-Institut (STIKO) eine prinzipielle Impfung für alle Kinder zwischen 11 und 14 Monaten eingeführt. Eine Impfung wird auch für ältere Kinder und Jugendliche ohne Varizellenanamnese empfohlen. Nachholeimpfungen sollten spätestens im Alter von 9 bis 17 Jahren erfolgen. Weiterhin wird die Varizellenimpfung seronegativen bzw. empfänglichen Personen empfohlen, für die Varizellen ein besonderes Risiko darstellen, wie Frauen mit Kinderwunsch, Patienten vor einer geplanten immunsuppressiven Therapie oder Organtransplantationen und Patienten mit schwerer Neurodermitis. Die Impfung ist ebenfalls für Personen indiziert, die Kontakt zu Risikopersonen haben oder in Gemeinschaftseinrichtungen für das Vorschulalter tätig sind. Eine Postexpositionsprophylaxe ist für empfängliche Personen mit Kontakt zu Risikopatienten möglich. 2006 erfolgte die Zulassung einer Vierfachimpfung gegen Mumps, Masern, Röteln und Varizellen (STIKO 2007). In den USA wurde die allgemeine Varizellenimpfung bereits im Jahr 1995 eingeführt. Eine Studie belegte einen fast vollständigen Rückgang von schweren Verläufen und Komplikationen sowie einen 90%igen Schutz vor Varizellen (Gershon 2001). Die Inzidenz von Windpocken ging in den USA um 71 bis 84% in allen Altersgruppen zurück (Gershon 2001). Ein Anstieg der Zosterinzidenz wurde bislang nicht beobachtet (Jumaan 2005).

In Deutschland erfolgt eine einmalige Impfung mit Varilrix® (GlaxoSmithKline, Brenton, Großbritannien) bzw. Varivax® (Aventis-Pasteur, Lyon, Frankreich) bei Kleinkindern und

Kindern bis zum vollendeten 13. Lebensjahr. Ältere Jugendliche und Erwachsene erhalten zwei Dosen. Die Vierfachimpfung gegen Mumps, Masern, Röteln und Varizellen unter Verwendung der Impfstoffe Priorix-Tetra[®] (GlaxoSmithKline) bzw. ProQuad[®] (Merck&Co; Sanofi-Pasteur, MSD) muss ebenfalls zweimal durchgeführt werden. Die Impfstoffe rufen bei Immunkompetenten eine humorale und zelluläre Immunantwort hervor und erreichen eine Serokonversion von 95% (Takahashi 2001). Varizellen-Impfstoffe sind generell gut verträglich. Bei ca. 4% der Impflinge kommt es zu Rötung und Schwellung am Injektionsort. Lokale Schmerzen wurden von 20% der Personen beschrieben. An der Einstichstelle wurde bei 3 bis 5% der Kinder über lokalisierte Effloreszenzen berichtet. Zwei bis sechs Wochen nach der Impfung kam es bei weiteren 3 bis 5% der Kindern zu varizellenartigen Hauterscheinungen, den Impfvarizellen (Sauerbrei 2006). Diese können in seltenen Fällen durch das Impfvirus bedingt sein. Auch durch das Impfvirus hervorgerufene Zostererkrankungen bei Kindern können gelegentlich auftreten (Uebe et al. 2002, Sauerbrei et al. 2004b, Liang et al. 2000).

Ein eigens entwickeltes Computermode (EVITA) errechnete durchschnittliche Kosten der Varizellen und ihrer Folgen bei Durchführung einer generellen Varizellenimpfung in Deutschland von 50 Millionen Euro jährlich (Hammerschmidt et al. 2004). Gegenüber den Kosten von 73 Millionen Euro, die ohne Massenimpfung entstehen, bedeutet dies eine Nettoersparnis von 23 Millionen Euro jährlich (Banz et al. 2003).

In den vergangenen Jahren wurden auch Zosterimpfstoffe (Zostavax[®], Merck) entwickelt, die bei älteren Personen empfohlen werden. Dazu wird der Impfstamm vOka in wesentlich höherer Konzentration verwendet. Amerikanische Studien zeigten nach Impfung von Personen im Alter von über 60 Jahren einen Rückgang der Zoster-Inzidenz um ca. 50%. Unter den Personen, die nach Impfung eine Gürtelrose entwickelten, sank die Zahl derer mit PZN um etwa 60% (Oxman et al. 2005, Kimberlin und Whitley 2007). In Deutschland wird die Einführung der Zosterimpfung erwartet.

2.6 Molekularbiologie des Varicella-Zoster-Virus

2.6.1 Morphologie

Die Viruspartikel des VZV haben einen Durchmesser von ungefähr 200 nm. Das Virus-Core besteht aus einer fibrillären Proteinmatrix, mit der das doppelsträngige lineare Genom assoziiert ist. Das Core wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, welches aus 162 Kapsomeren besteht. Die glykoproteinhaltige dreischichtige Hüllmembran (Envelope) umschließt das Kapsid. Zwischen Envelope und Kapsid befindet sich das Tegument. Die Viruspartikel können in den Bläschen von Patienten mit Varizellen und Zoster nachgewiesen werden. Abb. 3 zeigt eine schematische Zeichnung des VZV, Abb. 4 ein elektronenoptisches Bild.

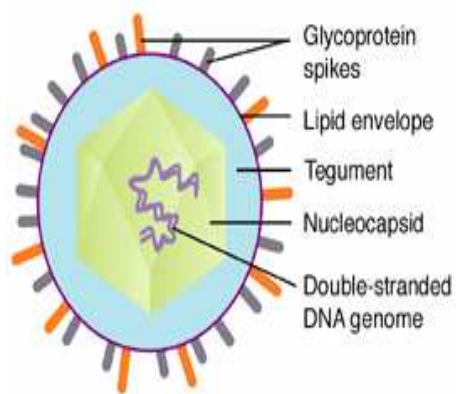


Abb. 3: Schematische Darstellung des VZV

Quelle:

<http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/fig001jbl.gif>
(11.12.2007)



Abb. 4: Elektronenoptische Darstellung des VZV

Quelle:

<http://content.answers.com/main/content/wp/en/thumb/1/1c/240px-Chickenpox-virus.jpg> (01.07.2008)

2.6.2 Genomorganisation des Varicella-Zoster-Virus

Das komplette Genom des VZV-Stammes *Dumas* wurde in den 80er Jahren veröffentlicht (Davison und Scott 1986). Es besitzt zahlreiche Sequenzhomologien zum HSV. Die Erbsubstanz umfasst etwa 125.000 Basenpaare (Bp) doppelsträngiger DNA. Wie andere Herpesviren besitzt es eine kodierende Unique-Long-Region (U_L) von 104.800 Bp Länge und

eine ebenfalls kodierende Unique-Short-Region (U_S) mit 5.232 Bp. U_L wird von den zwei kurzen Repeat-Regionen Terminal Repeat Long (TR_L) und Internal Repeat Long (IR_L) von jeweils 88 Bp eingerahmt. Die U_S -Domäne wird von den größeren Repeats Terminal Repeat Short (TR_S) und Internal Repeat Short (IR_S) mit jeweils 7.319 Bp begrenzt. Fünf Bereiche, die Repeat-Regionen R1 bis R5, enthalten Wiederholungen von Guanin (G) und Cytosin (C).

Im VZV-Genom konnten 72 offene Leserahmen (Open Reading Frame oder ORF) identifiziert werden. Die Leserahmen 42 und 45 bilden zusammen die Erbinformation für ein Genprodukt, drei weitere sind doppelt in TR_S und IR_S vertreten. Somit besitzt das VZV 68 einzigartige Gene. Im Genom sind zwei Replikationsursprünge (Origin of Replication, ORI) zwischen Leserahmen 62 und 63 sowie 70 und 71 vorhanden. Acht ORF kodieren für die Glykoproteine (g) gE, gB, gH, gI, gC, gL, gM und gK. Entsprechend dem Zeitpunkt ihrer Translationen werden die Gene in die Klassen Immediate Early (IE), Early (E) und Late (L) eingeteilt. In die vorliegende Arbeit wurden Sequenzen aus den ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60 und 62 einbezogen. Das Produkt der Translation von Leserahmen 1 ist ein Membranprotein der Klasse L ohne Homologie zu HSV-1 (Cohen und Seidel 1995). Über ORF 21 fanden Arbeitsgruppen heraus, dass dieser Genabschnitt ebenfalls zur Klasse L gehört, in neuronalen Zellen während der Latenz durch ORF 63 aktiviert wird. Außerdem ist sein Translationsprodukt, ein 115 Kilodalton (kDa) großes Protein, im Zytoplasma infizierter Zellen zu finden (Cohrs et al. 1998, Cohrs et al. 2002, Xia und Straus 1999, Mahalingam et al. 1998). Der Leserahmen 37 kodiert für gH (Forghani et al. 1994) und besitzt einen homologen Partner bei HSV-1. Das Translationsprodukt von ORF 50, gM, ist für eine effiziente Verbreitung des VZV von Zelle zu Zelle verantwortlich, nicht jedoch für die Vermehrung des Virus (Yamagishi et al. 2008). ORF 60 kodiert für gL, über dessen Funktion nicht viel bekannt ist. Eine Insertion ATG (CAT) im Gen 60 ist typisch für die Viren vom Genotyp J in der asiatischen Bevölkerung. Sie wurde bisher nur selten in Deutschland gefunden (Philipps 2007).

2.6.3 Lytischer Zyklus der Varicella-Zoster-Virus-Partikel

Eine Vermehrung von VZV findet nur in menschlichen Zellen oder in denen von Affen statt. Die Vorgänge des Infektionszyklus sind sehr schwer zu untersuchen, weil es kein geeignetes Tiermodell gibt.

Der Eintritt des Viruspartikels in die menschliche Zelle erfolgt durch Verschmelzung des viralen Envelope mit der Plasmamembran der Zelle. Die Mannose-6-Phosphate (Man-6-P) der Glykoproteine gB, gH und des gI binden an die Heparansulfate auf der Wirtszellmembran (Cohen und Nguyen 1997, Jacquet et al. 1998, Rodriguez et al. 1993, Zhu et al. 1995). Die Interaktionen zwischen den Man-6-P-Resten und den Man-6-P-Rezeptoren der Zielzelle führen zur Penetration des Virus in die Zelle. Es kommt zum Eintritt von Nukleokapsid und Tegument in das Zytoplasma.

Das Nukleokapsid wandert nun zur Kernmembran und verschmilzt mit ihr. So gelangt das virale Genom in den Zellkern, wo es zirkularisiert. Die Expression der VZV-Gene wird von verschiedenen Tegumentproteinen kontrolliert. Der wichtigste Regulator ist das Produkt von ORF 62, IE 62. Es initiiert die Transkription vieler VZV-Promotoren (Baudoux et al. 1995, Piette et al. 1995). Die durch IE 62 angeregte Proteinbiosynthese ist hoch reguliert und läuft in drei Stufen ab, die von der RNA-Polymerase der Wirtszelle abhängig sind. Zu Beginn findet die Translation der IE-Gene, einer Gruppe von transkriptionalen Regulatorproteinen, statt. Deren Produkte hemmen die weitere Transkription der IE-Gene und initiieren die zweite Stufe, die Expression der E-Gene. So kommt es zur Synthese der E-Proteine wie Helicase/Primase, DNA-Polymerase und einzelsträngigen DNA-bindenden Proteinen (ORF 29), die unter anderem mit Chaperonen und Hitzeschockproteinen interagieren (Kyratsous und Silverstein 2007). Sie formieren sich zu einem Komplex, der in den Zellkern eintritt und die virale DNA repliziert. Zum Schluss erfolgt die Transkription und anschließende Translation der L-Gene. Dadurch kommt es zur Bildung von strukturellen Komponenten wie Kapsid und die Glykoproteinen.

Die Transkription erfolgt nach dem Rolling-Circle-Prinzip. An den Sequenzen des ORI binden die einzelsträngigen DNA-bindenden und ORI-assoziierten Proteine. Daran kann der Komplex aus Helicase/Primase und DNA-Polymerase binden und die DNA-Synthese induzieren. Währenddessen entsteht ein DNA-Strang, der vielfache Einheiten des Virusgenoms in konkatemerer Anordnung enthält. Die Konkatemere werden in Einheits-Längengenome geschnitten und anschließend verpackt. Zeitgleich zur Replikation findet die

Translation der L-Gene am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Die Proteine werden synthetisiert und die Kapsidproteine ins Kernplasma transportiert. Dort werden das replizierte VZV-Genom und die Strukturproteine zum Vorkapsid zusammengebaut. Sie knospen durch die innere Kernmembran in den perinukleären Raum, wodurch sie ein temporäres Envelope erhalten. Anschließend werden die Vorkapside ins Lumen des ER transportiert. Durch die Verschmelzung von Envelope mit ER-Membran verlieren die Nukleokapside ihr vorläufiges Envelope und migrieren ins Zytoplasma. Sie sammeln sich anschließend am Trans-Golgi-Netzwerk unter Mitwirkung der Glykoproteine gE und gI. Die Nukleokapside knospen ins Lumen ab und werden mit ihrer finalen Hüllmembran versehen. Sie reifen zu infektiösen Virionen aus und werden an der Zelloberfläche freigesetzt. Die Ausbreitung findet in Form von Zell/Zellkontakten oder Zellfusion statt. Etwa acht Stunden nach Infektion sind virusspezifische Antigene sowohl in Zytoplasma als auch im Zellkern nachweisbar.

2.6.4 Molekulare Charakterisierung des Varicella-Zoster-Virus

- Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen

Mit der Einführung der Varizellen-Impfung war es nötig, zwischen dem attenuierten VZV-Lebendimpfstoff und verschiedenen VZV-Wildtypen zu unterscheiden, um die Sicherheit der Impfung überwachen zu können. Dazu dienten Polymerasekettenreaktion (PCR) und anschließende Charakterisierung von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) der ORF 38, 54 und 62 mit verschiedenen Restriktionsenzymen (ORF 38 : *PstI*, ORF 54 : *BglI*, ORF 62 *SmaI*) sowie der R5 repeat region (LaRussa et al. 1992, Loparev et al. 2000, Sauerbrei et al. 2003, Quinlivan et al. 2002).

Der in Deutschland bzw. Europa und Nordamerika dominierende Wildtyp hat eine Schnittstelle für *PstI* im ORF 38 (*PstI*⁺) und keine Schnittstelle für *BglI* im ORF 54 (*BglI*⁻). Er wurde in Deutschland bei ca. 80% der untersuchten VZV-Stämme nachgewiesen. Nach bisheriger Studienlage besitzen ca. 20% der untersuchten Stämme eine Schnittstelle für *BglI* (*BglI*⁺) (Sauerbrei und Wutzler 2007a). VZV-Stämme aus Großbritannien sind bis zu 20% *BglI*⁺, was auf die Bevölkerungsstruktur mit vielen Immigranten aus afrikanischen und asiatischen Regionen zurückgeführt wird. Bislang wurde in Deutschland nur ein *PstI*-negativer Wildtypstamm beschrieben (Sauerbrei und Wutzler 2007a). Der einzige in

Deutschland beschriebene Impfstamm erwies sich als *PstI*⁻, *BglI*⁺ (Hawrami und Breuer 1997, Sauerbrei et al. 2003). Im Vergleich dazu sind in Japan zirkulierende Wildtyp-Stämme zu 20-30% negativ für eine Schnittstelle von *PstI* in ORF 38 (Takada et al. 1995). Eine Beurteilung des *PstI*-RFLP erlaubt daher keine zuverlässige Unterscheidung von Wild- und Impftyp-Virus. Nur durch Restriktionsenzymanalyse des ORF 62 mittels *SmaI* ist es möglich, universell zwischen Impf- und Wild-Typstämmen zu unterscheiden (Loparev et al. 2000).

- **Single Nucleotide Polymorphisms und Varicella-Zoster-Virus-Genotypen**

Die Arbeitsgruppe um Peters wies mittels Ganzgenomsequenzierung eine hohe genetische Konstanz von über 99% bei verschiedenen gesammelten VZV-Isolaten nach (Peters et al. 2006). Prinzipiell ist das VZV-Genom als sehr konstant und in Bezug auf Mutationen als äußerst stabil anzusehen. Britische Forscher errechneten eine Rate von 1×10^{-7} bis $2,7 \times 10^{-8}$ Mutationen pro Jahr und Basenposition (McGeoch und Cook 1994). Zusätzlich zu den Mutationen scheinen Rekombinationsereignisse von großer Bedeutung für die Evolution des VZV zu sein. Sie können nur mittels Sequenzierung des kompletten viralen VZV-Genoms belegt werden (Norberg et al. 2006, Peters et al. 2006, Muir et al. 2002).

Die Sequenzierung von Fragmenten einer großen Zahl geografisch verschiedener Isolate führte zur Identifizierung zahlreicher Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) innerhalb des VZV-Genoms. Ein SNP ist als eine Variation eines einzelnen Basenpaares in der genomischen DNA definiert. Die bisherige Analyse dieser SNP läßt auf genetische Unterschiede der VZV-Stämme innerhalb unterschiedlicher geografischer Regionen schließen. Bislang gibt es mehrere Methoden zur Genotypisierung von VZV-Isolaten auf der Basis von SNP. Dies hat dazu geführt, dass sich auch die Nomenklatur der VZV-Genotypen unterscheidet (Tab. 2). Die Arbeitsgruppe um Loparev untersuchte ein 447 Bp großes Fragment im ORF 22 unter Einbeziehung weiterer DNA-Fragmente. Sie ordnete die Stämme den Genotypen E (Europäisch), J (Japanisch) sowie M1 und M2 (Mosaik) zu (Loparev et al. 2004, Loparev et al. 2007a, Loparev et al. 2007b). Eine andere Einteilung basiert auf britischen Publikationen (Barrett-Muir et al. 2003, Quinlivan et al. 2002). SNP in den ORF 1, 21, 50 und 54 dienten der Differenzierung des VZV in die Genotypen A (Afrika, Asien, Ferner Osten), B und C (Europa, Nordamerika, Brasilien) sowie J (Japan). Die Arbeitsgruppen um Faga und Wagenaar etablierten die Glykoprotein/IE62-Methode zur Unterscheidung von VZV-Isolaten aufgrund genetischer Polymorphismen in den Glykoprotein-Genen (Faga et al. 2001, Wagenaar et al. 2003). In ihren Studien wurden DNA-

Fragmente der ORF 31, 37, 60, 62, 67 und 68 amplifiziert und sequenziert. Es erfolgte eine Einteilung in die Genotypen A, B, C und D (Tab. 2). Die von Schmidt-Chanasit et al. (2007) etablierte Genotypisierungsmethode mittels Charakterisierung von Fragmenten der ORF 51, 52, 53, 56, 57 und 58 orientiert sich an der gleichen Nomenklatur. Die Genotypen A und D beinhalteten Stämme aus Nordamerika und Europa. Dabei entspricht der Genotyp A dem Genotypen C (Barrett-Muir et al. 2003) bzw. E1 (Loparev et al. 2007b). Die Isolate, die dem Genotypen D zugeordnet wurden, finden ihre Entsprechung in den Genotypen B (Barrett-Muir et al. 2003) und E2 (Loparev et al. 2007b). VZV-Isolate, die nach der Glykoprotein/IE62-Methode zum Genotyp C (Faga et al. 2001, Wagenaar et al. 2003) gerechnet wurden, können als Genotypen M2 (Loparev et al. 2007b) oder als Genotyp J (Barrett-Muir et al. 2003) identifiziert werden. Der Genotyp B entspricht den Genotypen J in beiden alternativen Nomenklatorsystemen (Barrett-Muir et al. 2003, Loparev et al. 2007b). Das Klassifizierungssystem nach Faga et al. (2001) und Wagenaar et al. (2003) enthält bislang nicht die separaten Genotypen A (Barrett-Muir et al. 2003) bzw. M1 (Loparev et al. 2007b). Die neu definierten Genotypen M3 und M4 können bisher nur mit der Methode von Loparev et al. (2007a) klassifiziert werden.

Tab. 2: Nomenklatur mittels verschiedener VZV-Genotypisierungsmethoden

(Barrett-Muir et al. 2003) Genotyp	(Loparev et al. 2007b) Genotyp	(Faga et al. 2001, Wagenaar et al. 2003) Genotyp
A	M1	nicht klassifiziert
B	E2	D
C	E1	A
J	J	B
J	M2	C

2.7 Zielstellung

Die Einführung der allgemeinen Varizellenimpfung macht eine Überwachung der zirkulierenden VZV-Stämme notwendig. Eine Erkrankung durch Impftyp-Viren ist sehr selten, aber prinzipiell möglich, was jedoch zuverlässig nachgewiesen und dokumentiert werden muss. Darüber hinaus ist auch die Entstehung rekombinanter Viren möglich. Eine zuverlässige Surveillance von VZV-Stämmen kann nur über eine genetische Analyse erfolgen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten 130 VZV-Stämme von Patienten mit Varizellen oder Zoster molekularbiologisch charakterisiert und verschiedenen Genotypen zugeordnet werden. Dabei sollte zuerst der Zugriff auf kultivierte Stämme erfolgen. Zu diesem Zweck wurde der Versuch der Virusanzüchtung in HELF durchgeführt, und etablierte Virusisolate wurden genetisch charakterisiert. Parallel dazu wurden die Originalmaterialien der Patienten für die Experimente herangezogen, wenn eine Vermehrung des Virus in der Zellkultur nicht möglich war. Im ersten Schritt der genotypischen Analyse sollte zwischen Wild- und Impftyp-VZV unterschieden werden. Dafür wurde ein DNA-Fragment aus dem ORF 62 ausgewählt und nach Amplifikation mittels Restriktionsenzymanalyse charakterisiert. Im zweiten Schritt wurden zur Unterscheidung verschiedener VZV-Genotypen DNA-Fragmente der ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60 amplifiziert und sequenziert. Als Referenz für die Auswertung der Rohdaten dienten die DNA-Sequenzen der VZV-Stämme *Dumas* und *pOka*, die der Genbank entnommen wurden. Die einbezogenen Patientenstämme sollten in Anlehnung an die Scattered-ORF-Methode von Barrett-Muir et al. (2003) den Genotypen A, B, C oder J zugeordnet werden, um einen Überblick über die in Deutschland vorhandenen VZV-Stämme zu erhalten. Zur Illustration der phylogentischen Zusammenhänge wurde ein Evolutionsbaum mit allen einbezogenen VZV-Stämmen sowie den Referenzstämmen *Dumas* und *pOka* errechnet. Dieser sollte neben der grafischen Darstellung von Genotypen und Subgenotypen dazu dienen, potentielle Rekombinanten zu erkennen.

In Auswertung der Untersuchungen sollten die gewonnen epidemiologischen Daten mit denen anderer europäischer und amerikanischer Arbeitsgruppen verglichen werden. Weiterhin war geplant, die eingesetzten Genotypisierungsmethoden kritisch zu bewerten und mit anderen international gebräuchlichen Verfahren zu vergleichen.

3 Materialien und Methoden

3.1 *Materialien*

3.1.1 Patienten

In die vorliegende Arbeit wurden 96 Virusstämme integriert, die bei ebenso vielen Patienten Varizellen ausgelöst hatten. Dabei stammten 90 aus den Jahren 2003 bis 2007. Sechs datierten aus den Jahren 1982, 1984, 1999 und 2000. Zusätzlich wurden 34 Virusmaterialien eingesetzt, die von Patienten mit Zoster gewonnen wurden. Dieser Gruppe gehörten vier Proben aus den Jahren 2000 und 2002 an, die restlichen 30 wurden in den Jahren 2003 bis 2007 entnommen. Die Patientenmaterialien wurden von Kliniken und Kinderarztpraxen in Erfurt, Jena oder Weimar zur Diagnostik an das Institut für Virologie und Antivirale Therapie eingesandt. Alle Patienten bzw. Erziehungsberechtigten im Falle von Kindern gaben ihr Einverständnis zum Sammeln und zur Untersuchung der gewonnenen Proben.

Das Alter der 96 Patienten mit Varizellen lag zwischen 5 Monaten und 61 Jahren. Das mittlere Alter betrug 6,1 Jahre. Vierzig der Patienten waren weiblichen und 55 männlichen Geschlechts. Bei einem Patienten konnten Geschlecht und Alter nicht angegeben werden. Zwei der 96 Patienten waren immunsupprimiert. Einer davon verstarb im Laufe der Erkrankung. Bei 89 Patienten konnte eine Immunsuppression ausgeschlossen werden. Von den übrigen fünf war der Immunstatus nicht bekannt. Eine Zusammenfassung dieser Informationen ist in Tab. 28 im Anhang zu finden.

Die 34 Zoster-Patienten waren zwischen 13 und 93 Jahre alt. Das mittlere Alter lag bei 50,8 Jahren. Von den Patienten waren 16 weiblichen und 18 männlichen Geschlechts. In der Gruppe der an Zoster Erkrankten standen acht unter dem Einfluss einer Immunsuppression. Der Immunstatus von dreizehn Patienten war nicht bekannt. Bei den restlichen dreizehn Personen konnte eine Defizienz des Immunsystems ausgeschlossen werden. Die Informationen über die verwendeten Materialien sind in Tab. 29 im Anhang aufgelistet.

3.1.2 Untersuchungsmaterialien der Patienten

Von den 130 Proben handelte es sich bei 128 um Bläscheninhalt und bei jeweils einer Probe um Liquor bzw. Hautgewebe. Nach der Entnahme der Patientenproben erfolgte mit Ausnahme des Liquors die Aufnahme der Abstrichmaterialien in Virustransportmedium und anschließend ein rascher Transport in die Untersuchungseinrichtung. Bei Eingang im Labor wurden aus 200 µl des Originalmaterials primär 50 µl DNA isoliert (siehe 3.2.3) und diese mittels PCR unter Verwendung von Primern der ORF 4 oder 28 (Sauerbrei et al. 1999, Puchhammer-Stöckl et al. 1991) auf VZV getestet. Bei positivem Ergebnis der PCR wurde mit 300-500 µl des Originalmaterials eine Virusanzucht versucht (siehe 3.2.2). Der Rest des eingesandten Materials sowie die primär isolierte DNA wurden bei –80°C eingefroren. Tab. 3 gibt einen Überblick über die Art der Untersuchungsmaterialien.

Tab. 3: Übersicht über die einbezogenen Untersuchungsmaterialien

Diagnose	Art des Untersuchungsmaterials	Gesamtzahl
Varizellen $\Sigma=96$	Bläscheninhalt	95
	Liquor	1
Zoster $\Sigma=34$	Bläscheninhalt	33
	Hautgewebe	1

3.1.3 Virusreferenzstämme

Die Virusstämme, die für die Auswertung der Rohdaten und die phylogenetische Analyse als Referenz dienten, sind in der folgenden Tab. 4 aufgelistet. Ihre Sequenzen wurden der Genbank entnommen. Der Stamm *Dumas* diente als Prototyp des europäischen Genotyps C. Der Stamm *pOka* wurde in Japan isoliert. Aus ihm wurden alle derzeit erhältlichen VZV-Impfstoffe entwickelt. Er stand als Vertreter des Genotyps J.

Tab. 4: Virusreferenzstämme

Stamm	Charakteristik	Genbank-Nummer
Humanes Herpesvirus (HHV) 3, Stamm <i>Dumas</i>	Europäischer Referenzstamm, Genotyp C	NC_001348
HHV 3, Stamm <i>pOka</i>	Genotyp J	AB097933

3.1.4 Oligonukleotidprimer

Als Basis für die Synthese der Primer dienten die Sequenzen des Stammes *Dumas* (NC_001348) bzw. Informationen der Arbeit von Loparev (Loparev et al. 2000). Die Bezeichnungen der Primer ergeben sich aus der Nummer des ORF und seiner Orientierung in vorwärts (F) und rückwärts (R) bzw. den Namen in der Originalarbeit.

Zur Herstellung derselben wurde der Expedite™ DNA/RNA Synthesizer 8909, Software-Version 2.4 (Applied Biosystems, Framingham, USA) verwendet. Das Gerät arbeitet mit der Festphasen-Phosphoramiditmethode. Säulen der Firma Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, dienten als Festphasenträger. Durch Behandlung mit 28%igem Ammoniak und 24stündiger Inkubation bei 55°C wurde die Abspaltung vom Festphasenträger und die Entschützung des Primers ermöglicht. Im Anschluss wurden die Oligonukleotide mittels Shimadzu HPLC LC 10AT Flüssigkeitschromatographie mit einer Mono Q 5/5 Anionenaustauschsäule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgereinigt, danach mit Sephadex G25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) entsalzt. Die abschließend getrockneten Primer wurden in 100 µl mit Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser (DEPC-H₂O) resuspendiert und auf eine Konzentration von 10 pM eingestellt. In Tab. 5 sind die Primersequenzen aufgeführt.

Tab. 5: Charakteristika der verwendeten Oligonukleotidprimer

ORF	Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Bindungsregion
1	Primer 48F	TCA GCT GGC TTT TCT AAG AAT TCG	427 - 450
	Primer 49R	TAT TTT TGG GAT CCG CAA TGT C	932 - 911
21	Primer 50F	TAA TGA ATT GAG GCG CGG TTT A	33497 - 33518
	Primer 51R	CAC GTG TAG CTC TAA AAA CCT AGG	33999 - 33976
37	Primer 61F	CTG CTC TTC TAC GAG AAT ATT CCG ACC G	66177 - 66204
	Primer 62R	CAA GGG GGT TTG GTG GGA ACG TAG T	66545 - 66521
50	Primer 52F	CGC ACC CAA AGT GAA CAT CAT	87736 - 87756
	Primer 53R	TCT CGG ATG TCA AAT ATG TTA CGA	88250 - 88227
54	Primer 59F	CCA GAA AGC CGC TGT AAG GGT GAG	95032 - 95055
	Primer 60R	TCG TTA CTT GAG TTT CTG CGT GGA	95474 - 95451
60	Primer 63F	GCC AGC CCC TTT AAG GTG ACG TAT G	101330 - 101354
	Primer 64R	ATA CGA CAA CGT CGT AGT GAA GGG	101687 - 101664
62	PKVL-1L	TTC CCA CCG CGG CAC AAA CA	106036 - 106055
	PKVL-6U	CGC GTC CAA CAC CAG CAA CC	106303 - 106284

3.1.5 Verwendete Chemikalien

In den Tab. 6 und 7 sind alle eingesetzten Chemikalien sowie fertig gelieferten Puffer, Enzyme und am Institut hergestellten Puffer und Medien aufgeführt.

Tab. 6: Chemikalien, fertig gelieferte Puffer, Enzyme und Medien

Bezeichnung	Hersteller [Kitsystem]
Agarose GTQ	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Agarose MP für kleine Fragmente	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
AL-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden [QIAamp Blood Mini Kit]
AW1- und AW2-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden [QIAamp Blood Mini Kit]
AE-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden [QIAampBlood Mini Kit]

Fortsetzung Tab. 6

Bezeichnung	Hersteller [Kitsystem]
Buffer (10x) with EDTA	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Buffer A (<i>Sma</i> I)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
DNA-Molecular Weight Marker V (8 Bp)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
DNA-Molecular Weight Marker XIII (50 Bp)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
DNA-Molecular Weight Marker XIV (100 Bp)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
dNTPs-Mix (je 10mM)	Q-Biogene Inc. , Heidelberg [Taq Core Kit 10]
EB (Elution Buffer)	Qiagen GmbH, Hilden [QIAquick Gel Extraction Kit]
Ethanol _{absolut}	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Serva, Heidelberg
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Formamid	Serva, Heidelberg
Hot Star Taq-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden [HotStar Kit]
L 15 Medium (nach Leibovitz)	Biochrom AG, Berlin
Lactalbuminhydrolysat in Hanks-Lösung	Gibco™, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
Lithiumchlorid 4 M	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Natriumacetat 1,5 M	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg [DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit]
Penicillin (100.000 IU/l)	Biochrom AG, Berlin
PE-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden [QIAquick Gel Extraction Kit]
POP6 (Performance Optimized Polymer 6)	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Protease	Qiagen GmbH, Hilden [QIAamp Blood Mini Kit]
Puffer für Taq-Polymerase, 10x	Q-Biogene Inc. , Heidelberg [Taq Core Kit 10]
Puffer für Hot Star-Polymerase, 10x	Qiagen GmbH, Hilden [HotStar Kit]
QG-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden [QIAquick Gel Extraction Kit]
Q-Solution	Qiagen GmbH, Hilden [HotStar Kit]
Sequenziermix	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg [DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit]
<i>Sma</i> I	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Streptomycinsulfat (0,1 g/l)	Biochrom AG, Berlin
Taq-Polymerase (5 U/l)	Q-Biogene Inc. , Heidelberg [Taq Core Kit 10]
Virustransportmedium	Copan, Brescia, Italien

Tab. 7: Puffer und Medienrezepturen

Bezeichnung	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	1 mg Diethylpyrocarbonat auf 999 ml Aqua dest., doppelt autoklaviert
Ladepuffer	40% Glycerin 0,1% EDTA 0,1% SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) 0,2% Bromphenolblau
Medium zur Kultivierung von HELF	50% Lactalbuminhydrolysat 50% L 15 Medium nach Leibovitz 10% fetales Kälberserum 100.000 IU/l Penicillin 0,1 g/l Streptomycinsulfat 200 mM L-Glutamin
TBE-Puffer (5x), pH 8,1	1.000 ml Aqua dest. 54,0 g Tris 27,5 g Borsäure 4,65 g EDTA
TE-Puffer	1.000 ml Aqua dest. 10 ml 1M Tris HCL, pH 8,0 2 ml 0,5 M EDTA

3.1.6 Agarosegele

Zur Darstellung der hergestellten DNA-Fragmente wurden 2%ige Gele (siehe 3.2.5) und zur Aufreinigung (siehe 3.2.7) 1,5%ige Gele aus Agarose GTQ verwendet. Für die Sichtbarmachung der Restriktionsfragmente nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *SmaI* dienten 4%ige Gele unter Verwendung der Agarose MP von Roche (Tab. 6).

Die Gele wurden durch Erhitzen bis zum Siedepunkt in einem Mikrowellengerät zubereitet. Die flüssigen und abgekühlten Gele wurden mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, anschließend in eine Gelkammer gegossen und mit einem Teflonkamm versehen. Nach Erstarren des Geles konnten die Kämmen entfernt und die Gele für die Elektrophorese verwendet werden. Das hinzugegebene Ethidiumbromid diente zur Sichtbarmachung der DNA-Banden unter UV-Licht.

In der nachfolgenden Tab. 8 ist die Zusammensetzung der Gele aufgelistet.

Tab. 8: Rezeptur der Agarosegele

Gel	Rezeptur
1,5%iges Gel	2,25 g Agarose GTQ 150 ml TBE 15 µl Ethidumbromid 0,1 µg/ml
2%iges Gel	0,7 g Agarose GTQ 35 ml TBE 3,5 µl Ethidiumbromid 0,1 µg/ml
4%iges Gel	6 g Agarose MP 150 ml TBE 15 µl Ethidiumbromid 0,1 µg/ml

3.1.7 Eingesetzte Kitsysteme

In Tab. 9 sind die Kitsysteme aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden.

Tab. 9: Eingesetzte Kitsysteme

Name	Hersteller	Verwendungszweck
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, München	Sequenzierung der DNA-Fragmente
Hot Star Kit	Qiagen GmbH, Hilden	Amplifikation eines Fragmentes aus ORF 62
QIAamp Blood Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden	DNA-Präparation aus Zellen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden	DNA-Aufreinigung aus Agarosegel
Taq Core Kit 10	Q-Biogene Inc., Heidelberg	Amplifikation der Fragmente der ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60

3.1.8 Geräte und technische Hilfsmittel

In Tab. 10 sind die Geräte und Hilfsmittel aufgelistet, die während der Arbeit im Labor verwendet wurden.

Tab. 10: Geräte und Hilfsmittel

Gerätename / Hilfsmittel	Hersteller
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biometra® TRIO-Thermoblock	Biometra - Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Blockthermostat BT 1302	HLC BioTech, Bovenden
Cryo Tube™	Vials Nunc™, Roskilde, Dänemark
Eppendorf-Pipetten für: 0,5–10 µl, 1-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl	Eppendorf, Köln
Eppendorf-Tubes : 0,5 ml (dünnwandig), 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Köln
Falcon Röhrchen Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Feinwaage Sartorius	Sartorius AG, Göttingen
Gelelektrophoresekammern -Hoefer® HE33 -Owl Buffer Puffer™ B3	Hoefer Inc., San Francisco, USA Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Sequenzierer ABI Prism® 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Stromversorgungsgeräte -Electrophoresis Power Supply EPS 300 -Electrophoresis Power Supply E 835	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Transilluminator	Biometra - Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Vakuumtrockner DNA 110 SpeedVac Savant	Global Medical Instrumentation, Ramsey, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturpassagierung

Zur Virusvermehrung wurden HELF verwendet. Diese wurden in einem Medium kultiviert, welches sich wie in Tab. 7 beschrieben zusammensetzte. Zur Passagierung wurden trypsinbehandelte HELF nach jeweils sieben Tagen in frisches Medium überführt und in neue Zellkulturflaschen eingesät. Zum Zweck der Virusvermehrung wurde der Gehalt an Kälberserum von 10% auf 5% reduziert.

3.2.2 Virusanzucht

Für die Anzucht des VZV wurden frische HELF-Suspensionen mit 7×10^5 Zellen/ml in T25-Zellkulturflaschen eingebracht. Die Zellsuspension wurde mit 300–500 µl des Patientenmaterials in Virustransportmedium infiziert und bei 36°C über zehn Tage inkubiert. Täglich wurden die beimpften Zellen auf das Vorhandensein von cpE untersucht. Waren zumindest 75% der Zellen zytopathisch verändert, wurde der Zellrasen abgeschabt und zur Passagierung in frisches Medium aufgenommen. Zur Konservierung wurde eine Suspension virusinfizierter Zellen bei –80°C tiefgefroren. War kein cpE zu beobachten, schlossen sich zwei weitere Zellkulturpassagen über jeweils zehn Tage an.

3.2.3 DNA-Präparation

Die Präparation der DNA aus den Originalmaterialien der Patienten bzw. einer Suspension virusinfizierter Zellen (siehe 3.2.2) erfolgte mit dem *QIAamp DNA Blood Mini Kit*. Zuerst wurden 200 µl Patientenmaterial mit 200 µl Lysispuffer und 20 µl Protease gemischt und 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde 15 sec gemischt, kurz abzentrifugiert und mittels Zugabe von 200 µl Ethanol sowie nachfolgendem Schütteln und Abzentrifugieren die Inkubation gestoppt. Das komplette Material wurde in eine *Qiagensäule* überführt. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 6.000 x g für 1 min an. Nach dem Wechsel des Auffangröhrchens und Verwerfen des Überstandes wurde zunächst mit 500 µl Waschpuffer 1 (AW1) und im

Anschluss mit 500 µl Waschpuffer 2 (AW2) bei 6.000 x g über jeweils 1 min zentrifugiert. Es folgte eine fünfminütige Trockenzentrifugation bei 16.000 x g.

Zum Abschluss wurde die Säule in ein 1,5 ml fassendes Eppendorfröhrchen mit Deckel gestellt. Nach Zugabe von 50 µl Elutionspuffer (AE) folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 6.000 x g über 2 min aus der Säule eluiert und bei -20°C eingefroren.

3.2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten

- Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Sequenzierung

Um die Fragmente der ausgewählten ORF zu sequenzieren, war es zunächst notwendig, die DNA mittels PCR zu amplifizieren. Das Prinzip der PCR wurde Mitte der 80er Jahre veröffentlicht (Mullis et al. 1986). Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung von Genomabschnitten, die durch die Primer determiniert sind. Hierbei führt das Gerät, der Thermocycler, zyklische Änderungen der Temperatur über einen bestimmten Zeitabschnitt durch. Während der Denaturierung werden die Wasserstoffbrückenbindungen in der Erbsubstanz durch die hohe Temperatur von 94°C aufgebrochen. Infolgedessen liegen virale DNA und Primer einsträngig vor. Im Laufe des Annealings bei 55°C hybridisieren beide. In der sich anschliessenden Elongation bei 72°C füllt die Taq-Polymerase beginnend am hybridisierten Primer die Stränge mit Nukleotiden auf. Das Ergebnis dieser Schritte über 30-45 Zyklen ist eine exponentielle Vermehrung des gewählten DNA-Fragments. Nach Abschluss der PCR verweilen die Proben bei 4°C im Thermocycler bis zur Entnahme. Die Herstellung der PCR-Reaktionsmischung (Tab. 11) zur Amplifizierung der VZV-ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60 erfolgte mit Chemikalien aus dem *Taq Polymerase Kit* und mit am Institut für Virologie und Antivirale Therapie hergestellten Primern.

Tab. 11: PCR-Reaktionsmischung zur Amplifizierung der ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60

Bestandteil	Menge
Polymerasepuffer 10x	5 µl
Nukleotide (jedes dNTP 10 mM)	1 µl
Senseprimer 50 pM	1 µl
Antisenseprimer 50 pM	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DNA-Probe (0,8 – 1,6 µg DNA)	2-4 µl
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl

Die Kinetik der Reaktion ist in Tab. 12 angegeben und erfolgte in Anlehnung an die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Sauerbrei (Sauerbrei et al. 2006).

Tab. 12: Kinetik der Fragment-PCR

Zyklusanzahl	Dauer	Temperatur	Vorgang
1	5 min	94 °C	Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge
45	50 sec 50 sec 1 min	94 °C 55 °C 72 °C	DNA-Denaturierung Primer-Annealing Elongation der DNA
1	5 min	72 °C	Finale Elongation
1	bis Entnahme der Proben	4 °C	Abkühlung der Proben

- Amplifikation eines DNA-Fragmentes des VZV-ORF 62 für die Restriktionsenzymanalyse

Der PCR zur Amplifikation eines DNA-Fragmentes von ORF 62 liegt ebenfalls das oben beschriebene Prinzip zugrunde. Im Unterschied dazu wurden allerdings nur 30 Zyklen durchgeführt und eine Polymerase mit Hot-Start-Eigenschaften (z.B. Hot Star Taq-Polymerase) gewählt. Die Hot Star Taq-Polymerase muss zunächst 15 min bei 95°C aktiviert werden. Die übrige Reaktionskinetik ist der Tab. 14 zu entnehmen und an frühere Untersuchungen angelehnt (Loparev et al. 2000). Für die Amplifikation von ORF 62 wurde der in Tab. 13 aufgeführte Reaktionsmix hergestellt (Loparev et al. 2000, Sauerbrei et al. 2003).

Tab. 13: Reaktionsmix zur Herstellung eines Fragmentes aus ORF 62

Bestandteil	Menge
Puffer 10x	10 µl
Nukleotide (jedes dNTP 10 mM)	2 µl
Senseprimer PKVL–6U 100 pM	1 µl
Antisenseprimer PKVL–1L 100 pM	1 µl
Hot Star Taq–Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
Q-Solution	2 µl
DNA–Probe (ca. 4 µg DNA)	10 µl
DEPC-H ₂ O	73,5 µl

Tab. 14: Kinetik der PCR für das Fragment von ORF 62

Zyklusanzahl	Dauer	Temperatur	Vorgang
1	15 min	95 °C	Denaturierung der DNA-Doppelstränge, Aktivierung der Hot Star Taq-Polymerase
30	1 min 1 min 1 min	94 °C 55 °C 72 °C	DNA-Denaturierung Primer Annealing Elongation der DNA
1	3 min	72 °C	Finale Elongation
1	bis Entnahme der Proben	4 °C	Abkühlung der Proben

3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Nach der PCR wurden die Amplifikate in einem 2%igen Agarosegel, das 0,1 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, sichtbar gemacht. Dazu wurde zuerst das erstarrte Gel in die Elektrophoresekammer Hoefer HE33 eingebracht und mit TE-Puffer bedeckt. Anschließend wurden jeweils 2 µl des Amplifikates der DNA-Fragmente der ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60 mit 8 µl TE-Puffer und 2 µl Ladepuffer versetzt. Zur Darstellung der Amplifikate von ORF 62 wurden 10 µl PCR-Produkt und 2 µl Ladepuffer eingesetzt. Im Folgenden wurden jeweils 10 µl dieser Mixturen in die Taschen des Gels pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard dienten die Marker XIV und XIII (Roche) in der jeweils letzten Tasche. Nach dem Elektrophoreselauf bei einer Spannung von 80-90 V für 1 h wurde das Gel im Transilluminator (Tab. 10) mit UV-Licht bestrahlt und photographisch dokumentiert, und die Banden wurden ausgewertet. Abb. 5 zeigt das Elektrophoresebild einer erfolgreichen VZV-PCR der DNA-Fragmente der ORF 1, 21, 50, 54, 37, 60 und 62 mit Banden an den entsprechenden Positionen.

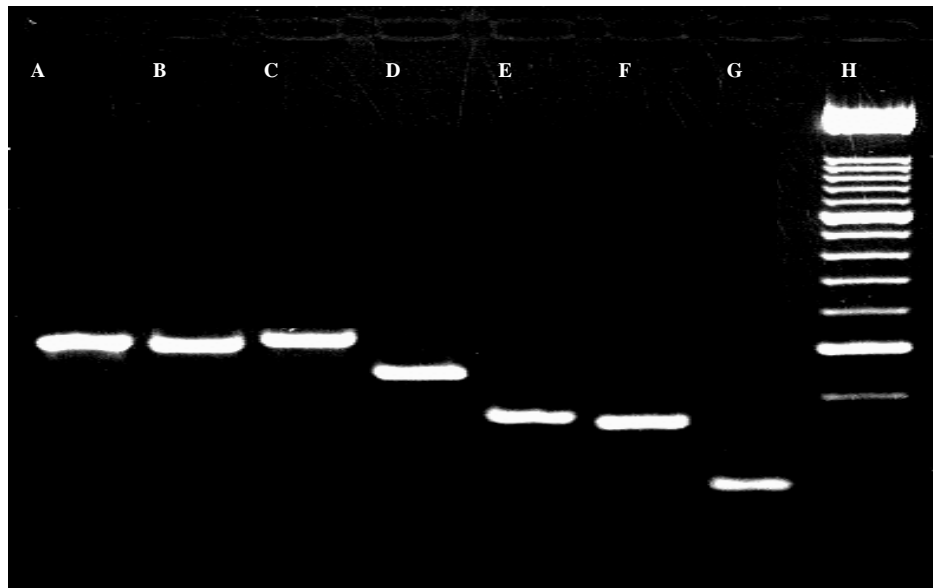


Abb. 5: Agarosegelelektrophorese nach Amplifikation von VZV-DNA-Fragmenten
DNA-Fragmente aus ORF 1 (A, 505 Bp), 21 (B, 502 Bp), 50 (C, 514 Bp),
54 (D, 442 Bp), 37 (E, 368 Bp), 60 (F 357 Bp), 62 (G 268 Bp)
H : 100 Bp-Molekulargewichtsstandard

3.2.6 Restriktionsenzymverdau

Der Restriktionsenzymverdau eines Fragmentes von ORF 62 mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* gilt als sichere Methode zur Differenzierung von Wild- und Impfstämmen (Loparev et al. 2000, Quinlivan et al. 2005). Die Erkennungssequenz von *SmaI* ist mit 5'-CCCGGG-3' definiert. Bei Wildtyp-Stämmen erfolgt ein Verdau des 268 Bp großen Amplifikats in drei DNA-Fragmente mit einer Größe von 153, 79 und 36 Bp. Werden Impfstämme verdaut, entstehen vier Bruchstücke mit einer Länge von 112, 79, 41 und 36 Bp. Das 153 Bp lange Segment wird bei ihnen zusätzlich in jeweils ein 112 und 41 Bp großes Fragment geschnitten. Das unterschiedliche Schnittmuster liegt im Nukleotid (Nt) 106.262 begründet, das bei Impfviren Cytosin (C) und bei Wildstämmen Thymin (T) enthält. Der Reaktionsansatz sowie die Durchführung wurden an bereits erschienene Veröffentlichungen angelehnt (Loparev et al. 2000, Sauerbrei et al. 2003).

Der Reaktionsansatz umfasste 10 µl Puffer A, 60 U *SmaI* sowie 84 µl Amplifikat. Das Gemisch wurde im Thermoschüttler bei 37°C und 650 Runden pro min für 4 h inkubiert. Danach wurde kurz abzentrifugiert und die Reaktion durch DNA-Präzipitation mit 2 µl 4 M

Lithiumchlorid sowie 250 µl Ethanol_{absolut} gestoppt. Die Ansätze wurden für 30 min bei –20°C bzw. 10 min bei –80°C gelagert. Nun wurde bei 16.000 x g für 15 min mit einer Temperatur von 4°C zentrifugiert, was zur Bildung eines sichtbaren Präzipitates führte. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die DNA für 20 min im Vakuumtrockner DNA 110 SpeedVac getrocknet. Es folgte die Resuspension in 15 µl TE-Puffer und 3 µl Ladepuffer. Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch über 135 min in einem 4%igem Agarosegel aufgetrennt. Als Standard diente der Marker V (Roche). Abb. 6 zeigt die entsprechenden DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese nach Restriktionsenzymverdau.

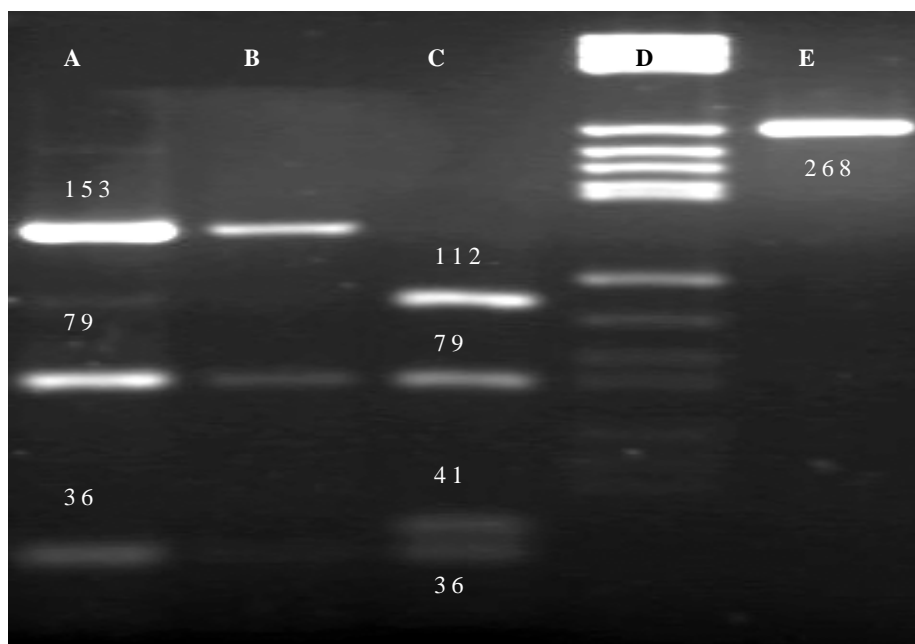


Abb. 6: Agarosegelelektrophorese nach Restriktionsenzymverdau mit *SmaI*

A : VZV-Wildtyp Typisches Spaltungsmuster mit drei Fragmenten : 153,79 und 36 Bp, **B : VZV-Wildtyp**

C : VZV-Impfstamm Spaltung in vier Fragmente : 112, 79, 41 und 36 Bp,

D : 5 Bp - Molekulargewichtsstandard **E : Nicht verdautes Amplifikat** mit 268 Bp Größe

3.2.7 Aufreinigung der Amplifikate mittels Gelextraktion

Um die amplifizierten DNA-Fragmente sequenzieren zu können, wurden sie zunächst mit dem *Qiaquick Gelextraction Kit* von überschüssigen Primern, Pufferresten und anderen störenden Substanzen gereinigt, welche die Sequenzierung behindern konnten. Das komplette Amplifikat wurde über ein 1,5%iges Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid 2 h bei 110 V

elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die Banden während der Darstellung im Transilluminator mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml-Eppendorfröhrchen überführt. Danach wurde das Gewicht der ausgeschnittenen Bande ermittelt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 56°C mit dem Dreifachen des Gelgewichts an Lösungspuffer (QG-Puffer). Nach dieser Zeit war das Gel resuspendiert.

Maximal 800 µl wurden in die *Qiagen Quick Spincolumn* pipettiert und 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Bei einem Gesamtvolumen größer als 800 µl wurde dieser Schritt wiederholt. Nach Verwerfen des eluierten Puffers wurde mit zusätzlichen 500 µl QG-Puffer noch einmal eine Zentrifugation über 1 min bei gleicher Drehzahl durchgeführt. Das eluierte Volumen wurde wiederum verworfen. Es folgte ein Reinigungsschritt mit 750 µl PE-Puffer bei 16.000 x g für 1 min. Im Anschluss wurde die Säule 1 min bei 16.000 x g trocken zentrifugiert. Nach Überführung in das endgültige Gefäß und Zugabe von 20-50 µl Elutionspuffer (EB) entsprechend der Bandenstärke wurde die DNA bei 16.000 x g innerhalb 1 min eluiert.

3.2.8 Sequenzierung der DNA-Fragmente

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten mit der Kettenabbruchmethode erforderte zuerst eine PCR mit den vier Desoxyribonukleotiden (dNTPs), vier mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxyribonukleotiden (ddNTPs) sowie einem Primer. Sobald ein ddNTP eingebaut wird, ist die Polymerase außerstande, die Reaktion fortzusetzen. Es kommt zum Kettenabbruch unter Bildung verschieden langer Bruchstücke jeweils nur einer Orientierung (Vorwärts- oder Rückwärtsstrang), deren Enden fluoreszierend markiert sind. Mittels Elektrophorese im Sequenzierer kommt es durch die Bruchstücke zum Signalanstieg jeweils eines Nukleotides pro Position.

Dies ist eine Weiterentwicklung der bekannten Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977), die zuerst von Sears et al. (1992) und später von Slatko (1996) modifiziert wurde (Sears et al. 1992). Durch Gelelektrophorese im Sequenzierer Abi Prism 310 und Auswertung der Daten mit der Software MEGA 3.1 konnten die Sequenzen ermittelt werden (Kumar et al. 2004). Abb. 7 gibt einen Überblick über die Sequenzierungsstrategie und den Einsatz der Primer.

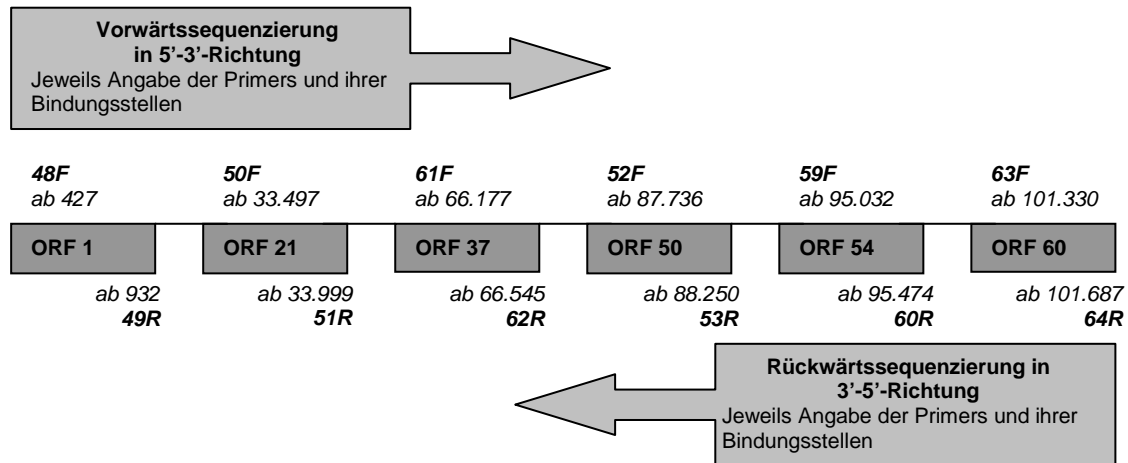


Abb. 7: Sequenzierungsstrategie für die Fragmente der VZV-ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60 nach Philipps (2007)

Für die Sequenzier-PCR wurde die in Tab. 15 aufgeführte Zusammensetzung des Reaktionsmixes verwendet.

Tab. 15: Reaktionsmix für die Sequenzier-PCR

Bestandteil	Menge
Sequenziermix	2 µl
Jeweils ein Primer 25 pM	0,5 µl
Aufgereinigte virale DNA	1-5 µl
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl

Tab. 16 gibt einen Überblick über die Kinetik der Sequenzier-PCR.

Tab. 16: Kinetik der Sequenzier-PCR

Zyklusanzahl	Dauer	Temperatur	Vorgang
1	5	95°C	Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge
25	20 sec 15 sec 1 min	95°C 50°C 60°C	DNA-Denaturierung Primer-Annealing Elongation der DNA
1	10 min	60°C	Finale Elongation
1	bis Entnahme	4°C	Abkühlung der Proben

Nach der PCR wurde das Amplifikat in 10 µl Aqua bidest. überführt und mit 2 µl kaltem 1,5 M Natriumacetat und 80 µl 99%igem Ethanol versetzt, welches die Reaktion durch DNA-Präzipitation stoppte. Es folgte eine Zentrifugation bei 16.000 x g für 25 min und anschließend ein Waschen mit 200 µl 80% Ethanol, welcher unter Schonung des Pellets sofort abpipettiert wurde. Zum Abschluss wurde abermals 2 min bei gleicher Beschleunigung zentrifugiert, der Überstand verworfen und 10 min im Vakuum getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 20 µl Formamid. Nun wurde die Probe im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer sequenziert, und die Rohdaten wurden mit den Referenzstämmen (siehe Tab. 4, Seite 22) verglichen.

3.2.9 Analyse der Sequenzrohdaten

Die Sequenzen der verwendeten Patientenisolate wurden mit den als Referenzen angegebenen VZV-Stämmen *Dumas* und *pOka* verglichen. Als grafische Oberfläche und zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums diente das Programm MEGA 3.1 (Kumar et al. 2004). Für den Stammbaum wurden zwei Alignments erstellt, zum einen auf der Grundlage der sechs sequenzierten Fragmente (ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60) und zum anderen auf der Basis von vier Fragmenten (ORF 1, 21, 50 und 54), da nicht immer alle Fragmente amplifiziert werden konnten.

Zur Analyse im Neighbour-Joining-Test wurden folgende Parameter festgesetzt:

Kimura2-Parameter, Berücksichtigung von Transition und Transversion, 1.-3. Codonposition und Deletion von fehlenden Daten im Alignment. Die Signifikanz der berechneten Verzweigungen wurde mittels Bootstrap-Analyse mit 10.000 Wiederholungen im Neighbour-Joining-Test sichergestellt (Kumar et al. 2004). Das in MEGA 3.1 implementierte Programm *TreeView* diente zur Bearbeitung des Stammbaumes.

3.2.10 Statistische Analyse

Die Verteilung der Hauptgenotypen des VZV wurde statistisch mittels Vierfeldertest-Test geprüft. Dieser Test dient zur Sicherung bzw. zum Ausschluss eines Unterschiedes in der Verteilung einer Prüfgröße in mindestens zwei Grundgesamtheiten. Dabei errechnet sich die Prüfgröße w bei einer gegebenen Vierfeldertafel wie folgt :

$$W = \{ (a*d-b*c) * \sqrt{(n1+n2)} \} / \{ \sqrt{n1*n2*(a+c)*(b+d)} \}$$

Durch Vergleich der Prüfgröße mit den Werten der Quantiltafel der Standardnormalverteilung kann über die Nullhypothese entschieden und somit ein signifikanter Unterschied gesichert bzw. ausgeschlossen werden (Heike und Târcolea 2000, Vollandt 2005). Als Grundgesamtheiten dienten die beiden Patientengruppen „Varizellen“ und „Zoster“. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen signifikanten Unterschied wurde mit $p < 0,05$ definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Anzucht des *Varicella-Zoster-Virus*

Von 96 VZV-Stämmen, die von Varizellen-Patienten gewonnen worden waren, wurden 13 in HELF angezüchtet. Zwölf von diesen stammten aus Bläscheninhalt (134/82, 78/84, 413/00, 463/00, 842/00, 1266/06, 2394/06, 298/07, 405/07, 445/07, 446/07, 500/07) und einer aus Liquorpunktat (623/98). Aus den Materialien der 34 Patienten mit Zoster konnten neun (243/00, 375/00, 665/00, 914/00, 596/02, 1571/06, 52/07, 391/07, 431/07) kultiviert werden, die allesamt von Bläscheninhalt gewonnen worden waren. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tab. 17 sowie in den Tab. 30 und 31 im Anhang zusammengefasst.

Tab. 17 : Ergebnisse der Virusanzucht

Diagnose der Patienten	Untersuchungsmaterial		Etablierte VZV-Isolate in der Zellkultur
	Art	Anzahl	
Varizellen (n=96)	Bläscheninhalt	95	12
	Liquorpunktat	1	1
Zoster (n=34)	Bläscheninhalt	33	9
	Hautgewebe	1	0
Summe	130		22

4.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Mittels PCR wurden mit den angegebenen Primern (Tab. 5) die Fragmente der ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60 hergestellt. Für die Amplifikation der kultivierten VZV-Stämme wurde auf die zweiten bis zehnten Zellkulturpassagen zurückgegriffen. Im einzelnen wurde bei 134/82 und 78/84 die zehnte, bei 842/00 die neunte, bei 665/00 und 914/00 die siebente, bei 243/00 die sechste sowie bei 413/00, 463/00 und 1571/06 die vierte Passage eingesetzt. Von den Stämmen 623/98, 375/00, 1266/06, 2394/06, 298/07, 391/07, 405/07, 431/07, 445/07, 446/07 und 500/07 fanden jeweils dritte Passagen Verwendung, während im Fall von 596/02 und

52/07 die jeweils zweite Passage für die Untersuchungen herangezogen wurde (siehe Tab. 30 und 31 im Anhang).

Besonderer Wert wurde auf die Fragmente der Leserahmen 1, 21, 50, 54 gelegt, da diese durch Sequenzierung eine zuverlässige Zuordnung der VZV-Stämme zu den vier Hauptgenotypen A, B, C und J des VZV ermöglichen (Sauerbrei et al. 2003, Loparev et al. 2004, Barrett-Muir et al. 2003, Sauerbrei et al. 2007). Nach erfolgreichem Nachweis der genannten Fragmente wurde eine weitere Amplifikation der ORF 37 und 60 versucht, wodurch eine genauere Typisierung der Stämme angestrebt wurde (Faga et al. 2001).

Die Amplifikation der ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60 gelang bei 79 von 96 Varizellen- und bei 31 von 34 Zoster-Isolaten, insgesamt also bei 110 VZV-Stämmen. Unter diesen befanden sich zwölf der dreizehn kultivierten Varizellen- sowie alle neun in der Zellkultur etablierten Zoster-Stämme. Der Nachweis der ORF 1, 21, 50 und 54 gelang bei 16 Materialien von Varizellen-Patienten, einem angezüchteten Varizellen-Stamm sowie bei einem Patientenmaterial aus Zosterbläschen und somit bei 18 Materialien. Bei dem VZV-Stamm mit der Labornummer 126/03 konnten ORF 50 und bei 578/03 ORF 1 und 21 nicht amplifiziert werden. In Tab. 18 ist angegeben, wie viele Fragmente in den jeweiligen VZV-Stämmen nachgewiesen werden konnten.

Tab. 18: Ergebnisse der Amplifikation der ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60

Untersuchungsmaterial	Amplifikation der ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60	Amplifikation der ORF 1, 21, 50, 54
Varizellen (n=96)		
Patientenmaterialien (n=83)	67	16
Zellkulturisolate (n=13)	12	1
Zoster (n=34)		
Patientenmaterialien (n=25)	22	1
Zellkulturisolate (n=9)	9	0
Summe (n=130)	110	18

4.3 Amplifikation und Restriktionsenzymanalyse des Open Reading Frame 62

Von 130 untersuchten Zellkulturisolaten und Patientenmaterialien konnte die Amplifikation des gewählten DNA-Fragments von Gen 62 bei 105 (81%) durchgeführt werden. Der Verdau gelang bei 99 von diesen 105 Virusstämmen (94%). Dies sind 76% der insgesamt 130 einbezogenen Materialien. Alle untersuchten VZV-Stämme waren für *SmaI* negativ und somit als VZV-Wildtypen einzuordnen.

Von den 96 Varizellen-Stämmen konnte bei 79 das DNA-Fragment von Gen 62 nachgewiesen werden. Die Restriktionsenzymanalyse gelang bei 74 Stämmen (77%). Unter diesen fanden sich alle 13 kultivierten Isolate sowie 61 Originalmaterialien. Das Amplifikat von Gen 62 konnte bei 26 von 34 Materialien der Zoster-Patienten nachgewiesen werden. Ein erfolgreicher *SmaI*-Verdau wurde bei 25 der 26 Stämme (74% von 34) per Gelelektrophorese bestätigt. Acht jener 25 wurden vorher in der Zellkultur etabliert, die restlichen 17 Amplifikationen waren mit Originalmaterialien durchgeführt worden. Für diese Angaben wird auf die Tab. 30 und 31 im Anhang verwiesen.

4.4 Sequenzierung und Genotypisierung

4.4.1 Analyse der Open Reading Frames

Es konnten bei 106 von 130 Proben alle sechs Leserahmen entsprechend der Aufgabenstellung sequenziert werden. Von diesen 106 stammten 76 von Patienten mit Varizellen. Unter jenen befanden sich 12 in der Zellkultur etablierte VZV-Stämme, bei den 64 restlichen waren die Originalmaterialien eingesetzt worden. Die übrigen 30 Materialien stammten von Personen mit dem Krankheitsbild Zoster. Unter ihnen waren 8 kultivierte und 22 nicht kultivierte Stämme.

Zwanzig weitere Materialien wurden jeweils mindestens auf SNP in den ORF 1, 21, 50 und 54 untersucht. Unter diesen befanden sich 18 Originalmaterialien von Varizellen-Patienten, ein Varizellen-Isolat sowie ein nicht kultivierter Stamm von einem Zoster-Patienten. In den Tab. 30 und 31 im Anhang sind amplifizierte, aber nicht sequenzierte Bereiche grau und nicht

amplifizierte DNA-Fragmente schwarz unterlegt dargestellt. Tab. 19 gibt einen Überblick über den Umfang der sequenzierten DNA-Fragmente.

Im Falle von vier Patientenmaterialien konnten trotz erfolgreicher Amplifikation einzelne DNA-Fragmente nicht sequenziert werden. Dies betraf bei den Varizellen-Stämmen 535/04 ORF 1, 542/04 ORF 37 sowie 1177/04 ORF 60 und bei dem Zoster-Stamm 1881/03 ORF 50.

Tab. 19: Sequenzierung der DNA-Fragmente aus den ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60

Untersuchungsmaterial	Sequenzierung der ORF 1, 21, 37, 50, 54, 60	Sequenzierung der ORF 1, 21, 50, 54
Varizellen (n=96)		
Patientenmaterialien (n=83)	64	18
Zellkulturisolate (n=13)	12	1
Zoster (n=34)		
Patientenmaterialien (n=25)	21	1
Zellkulturisolate (n=9)	9	0
Summe (n=130)	106	20

Aus den 106 entsprechend der Aufgabenstellung vollständig sequenzierten Viren wurde auf Basis der dokumentierten SNP (siehe 4.4.2 ff.) ein Stammbaum errechnet (siehe Abb. 9, Seite 50), der die phylogenetischen Beziehungen der Stämme untereinander illustriert. Die 20 durch vier ORF charakterisierten Viren wurden zusammen mit den ersten 106 in sechs ORF charakterisierten Stämmen in einen zweiten Stammbaum (siehe Abb. 10, Seite 51) integriert, der die errechnete Verwandtschaft aufgrund der SNP in den vier DNA-Fragmenten zeigt. Die Stämme 535/04, 126/03, 578/03 und 1881/03 wurden aufgrund des Fehlens eines oder mehrerer Fragmente der ORF 1, 21, 50 oder 54 nicht in die phylogenetische Analyse aufgenommen (siehe Tab. 30 und 31).

4.4.2 Single Nucleotide Polymorphisms

In den sechs untersuchten ORF wurden insgesamt 25 SNP gefunden, davon sechs SNP in ORF 1, acht SNP in ORF 21, zwei SNP in ORF 37, ein SNP in ORF 50, sieben SNP in ORF 54 und ein SNP in ORF 60. Zwölf dieser SNP führen zu einer veränderten Aminosäure(AS)-Struktur. Ausgewählte Sequenzierrohdaten nachgewiesener SNP sind in der Abb. 8 (Seite 44) enthalten. Alle beschriebenen Polymorphismen mit der Zuordnung zu den einzelnen

Virusstämmen sind in den Tab. 30 und 31 im Anhang aufgeführt. Tab. 20 im Anschluss an das Kapitel 4.4.3 enthält eine Auflistung der hier beschriebenen SNP, wie sie für die Genotypen und Subgenotypen des VZV typisch sind.

Insgesamt wurden in ORF 1 sechs Punktmutationen gefunden, wobei vier davon zur Substitution der betreffenden AS führen. In ORF 1 unterscheiden sich die Referenzstämme *Dumas* und *pOka* an den Positionen 685 und 789 bis 791. Der Stamm *pOka* hat am Nt 685 Adenin (A), *Dumas* dagegen Guanin (G), das bei allen untersuchten Patientenstämmen gefunden wurde. Dieses SNP hat keine Änderung der AS-Struktur zur Folge. Die drei aufeinanderfolgenden Nt 789 bis 791 sind bei *Dumas* alle mit Thymin, bei *pOka* alle mit Cytosin besetzt. Das führt zur Aminosäuresequenz Threonin, Glutamin, Glutamin bei *Dumas* bzw. Alanin, Arginin, Arginin bei *pOka*. Die Nukleotidsequenz TTT der Nt 789 bis 791 wurde in 107 und CCC in 21 Patientenstämmen gefunden. Ein weiteres SNP befand sich an Position 626 eines Virusisolates (52/07). Der Austausch von Adenin gegen Guanin hat den Einbau von Valin anstelle von Alanin zur Folge. Das Nt 762 war bei zwei Stämmen (78/84, 12/04) verändert, wobei Guanin gegen Adenin ausgetauscht wurde. Diese Basenmutation führte jedoch zu keiner Änderung der Primärstruktur.

Im ORF 21 konnten acht SNP dokumentiert werden, von denen vier eine Änderung der Proteinstruktur verursachen. Die Unterschiede zwischen *Dumas* und *pOka* an drei Positionen im Leserahmen 21 haben keine Veränderung der AS-Struktur zur Folge. Die Nt 33.722, 33.725 und 33.728 sind bei *pOka* jeweils mit Cytosin, bei *Dumas* mit Thymin besetzt. Im Nt 33.722 wurde bei allen untersuchten Materialien Cytosin gefunden, was *pOka* entspricht. Die Positionen 33.725 und 33.728 waren bei 92 Virusstämmen mit Thymin (*Dumas*) und bei 37 mit Cytosin (*pOka*) besetzt. Die Punktmutation im Nt 33.540 (G>A), verantwortlich für einen Aminosäurewechsel (Valin>Isoleucin), wurde in einem Patientenstamm (1715/03) gefunden. Das SNP an Nt 33.653 (G>T), ebenfalls Ursache für eine AS-Substitution (Methionin>Isoleucin), wurde im Stamm 1565/06 nachgewiesen. Das veränderte Nt 33.646 (G>A) führte bei zwei Zellkulturisolaten (445/07, 446/07) zur Änderung der AS-Sequenz (Glycin>Glutamat). Eine weitere Punktmutation an Position 33.654 (A>C) verursachte eine alternative AS-Struktur (Methionin>Isoleucin) bei den Stämmen 78/84 und 12/04. Das SNP im Nt 33.927 (T>G) einer Non Coding Region (NCR) wurde in den Patientenmaterialien 956/04, 1045/04 und 1069/04 nachgewiesen.

Im ORF 37 wurden zwei SNP nachgewiesen, von denen ein SNP Auswirkung auf die AS-Sequenz hat. Prinzipiell unterscheiden sich *Dumas* und *pOka* im ORF 37 nicht. Die

Punktmutation an Nt 66.288 (G>A) führt zu einer Substitution von Arginin durch Lysin. In 56 der untersuchten Stämme fand sich in den DNA-Sequenzen Guanin, bei 61 Adenin. Das SNP an Position 66.350 (C>T), nachgewiesen bei einem Virusstamm (2521/03), bleibt „still“.

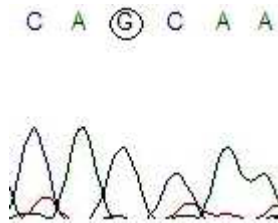
Im sequenzierten Abschnitt von ORF 50 unterscheiden sich *Dumas* und *pOka* im Nt 87.841 (*Dumas*: C, *pOka*: T). Diese Basenveränderung ist nicht mit einer Veränderung der AS-Sequenz verbunden. Bei 92 der in diesem Leserahmen untersuchten Stämme fand sich Thymin und bei 36 Cytosin.

Drei der sieben nachgewiesenen Punktmutationen in ORF 54 führen zu einer Änderung der AS-Struktur. *Dumas* und *pOka* unterscheiden sich im Nt 95.241 voneinander (*Dumas*: T, *pOka*: C), ohne dass dies Auswirkung auf die AS-Struktur hat. Thymin wurde an dieser Position bei 109 Stämmen, Cytosin bei 21 Stämmen nachgewiesen. Die Base im Nt 95.226 unterscheidet sich bei zwei Stämmen (405/07 : G, 1029/04 : C) von *Dumas* (T), jedoch verändert die Mutation die AS-Sequenz nicht. Eine ebenfalls „stille“ Punktmutation (G>T) ließ sich im Nt 95.262 von acht Stämmen dokumentieren. Das SNP des Nt 95.300 (C>T) führt zum Austausch von Glycin durch Serin. Es wurde bei 21 Virusstämmen gefunden. In zwei Fällen (78/84, 12/04) ließ sich ein Basenaustausch an der Position 95.319 (T>G) nachweisen, der ebenfalls keine Konsequenz für die AS-Struktur hat. Die Basensubstitution im Nt 95.333 (T>C) führt zu einer veränderten Proteinstruktur (Asparagin>Aspartat), die bei 14 VZV-Stämmen nachweisbar war. Die Punktmutation an der Base des Nt 95.339 (C>T) ist gleichfalls mit einer AS-Substitution (Glutamat->Lysin) verbunden. Dies konnte bei den beiden Stämmen 750/03 und 907/04 dokumentiert werden.

Die Referenzstämme *pOka* und *Dumas* unterscheiden sich im sequenzierten DNA-Abschnitt des Leserahmens 60 nicht. Bei 14 der einbezogenen Stämme wurde eine „stille“ Punktmutation an der Position 101.464 (C>A) identifiziert, während Cytosin in 101 Materialien nachgewiesen wurde.

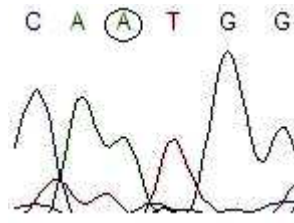
Nt 626 (ORF1), A>G

52/07



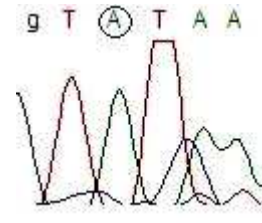
Nt 762 (ORF 1), G>A

78/84 und 12/04



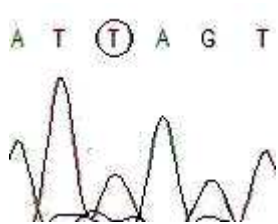
Nt 33.540 (ORF 21), G>A

1715/03



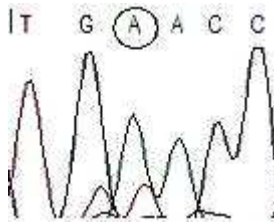
Nt 33.653 (ORF 21), G>T

1565/06



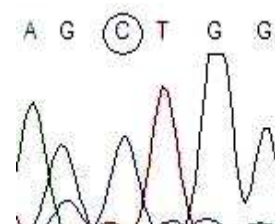
Nt 33.646 (ORF 21), G>A

445/07, 446/07



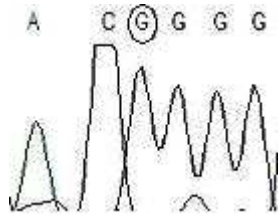
Nt 33.654 (ORF 21), A>C

78/84, 12/04



Nt 33.927 (ORF 21), T>G

956/04, 1045/04, 1069/04



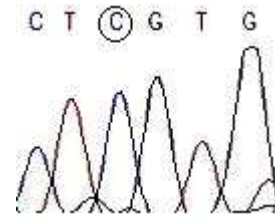
Nt 66.350 (ORF 37), C>T

2521/03



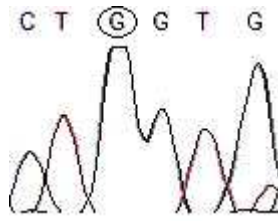
95.226 (ORF 54), T>C

1029/04



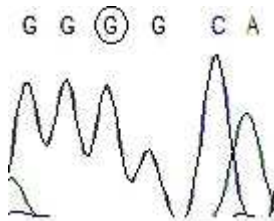
Nt 95.226 (ORF 54), T>G

405/07



Nt 95.319 (ORF 54), T>G

78/84, 12/04



Nt 95.241 (ORF 54), T>C

1177/06

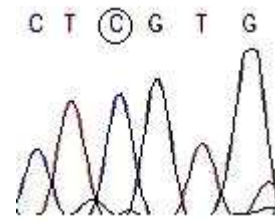


Abb. 8: Auszug aus den ausgewerteten Sequenzierdaten

Darstellung der SNP in ausgewählten ORF des VZV. Das betreffende Nt ist mit einem Kreis versehen.

4.4.3 Genotypen des Varicella-Zoster-Virus

Die Nomenklatur zur Einordnung aller analysierten VZV-Stämme wurde von der Arbeitsgruppe um Barrett-Muir et al. (2003) übernommen und die Subtypisierung entsprechend der Arbeit von Philipps (2007) weitergeführt. Die 96 einbezogenen **Varizellen-Stämme** verteilten sich wie folgt auf die einzelnen Genotypen:

- Genotyp C: 20 Stämme
- Genotyp B: 54 Stämme
- Genotyp A: 20 Stämme

Es wurde kein Vertreter des Genotyps J gefunden. Zwei Stämme, 1820/06 und 535/04, konnten nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden. Sie wurden beide als mögliche Rekombinanten eingestuft.

Die Virusstämme der 34 einbezogenen **Zoster-Patienten** ließen sich wie folgt klassifizieren:

- Genotyp C: 17 Stämme
- Genotyp B: 17 Stämme

In der Gruppe der Zoster-Patienten fanden sich keine Vertreter der Genotypen A und J. Die typischen genetischen Marker aller nachgewiesenen Haupt- und Subgenotypen sind in Tab. 20 auf den Seiten 48 und 49 zusammengestellt.

Die Abb. 9 und 10 auf den Seiten 50 und 51 demonstrieren die mit MEGA 3.1 berechneten phylogentischen Beziehungen der analysierten VZV-Stämme untereinander. Im ersten Evolutionsbaum in Abb. 9 ist das Ergebnis der Berechnung bei Einbeziehung der ORF 1, 21, 50 und 54 dargestellt. In ihn konnten auch die 20 Stämme einfließen, bei denen die Sequenzierung bzw. Amplifizierung der Fragmente aus ORF 37 und 60 nicht gelang. Abb. 10 faßt eine Berechnung aus allen sechs sequenzierten ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60 zusammen. Beide Stammbäume wurden mittels Neighbour-Joining-Test und Bootstrap-Analyse mit 10.000 Wiederholungen errechnet und unter Zuhilfenahme von Treeview dargestellt. Der Maßstab entspricht der Anzahl der Basensubstitutionen pro Position.

- **Stämme des Genotyps C**

Insgesamt 37 Stämme wurden dem Genotyp C zugeordnet. Alle Genotyp-C-Stämme unterschieden sich von *Dumas* nur im Nt 33.722 (T>C). Zu ihnen wurden unter Vorbehalt

auch 126/03 und 1881/03 gezählt, deren Sequenzierung nicht vollständig gelang. Das Isolat 2521/03 konnte dem bereits beschriebenen Subgenotyp C2 zugeordnet werden (Philipps 2007). Dieser war durch das SNP (C>T) im Nt 66.350 des ORF 37 charakterisiert. Aufgrund weiterer nachgewiesener SNP wurden in Ergänzung der bereits vorliegenden Daten von Philipps (2007) die Subgenotypen C4-C7 definiert. Die Stämme 750/03 und 907/04 wurden dem Genotyp C4 zugeordnet, welcher sich durch ein „stilles“ SNP im Nt 95.262 und ein weiteres SNP im Nt 95.339 (Glutamat>Lysin) auszeichnet. Die Patientenstämme 956/04 1045/04, 1069/04 wurden als C5 identifiziert. Ihr genetisches Profil umfasste zwei „stille“ SNP an den Positionen 33.927 (T>G) im ORF 21 und 95.262 (G>T) im ORF 54. Die drei C6-Stämme 243/00, 710/03 und 1379/04 haben ein SNP im Nt 95.262 (G>T). Der Stamm 1029/04, eingeordnet als C7, zeigte ein stilles SNP in dem Nt 95.226 (T>C).

- Stämme des Genotyps B

Von den 71 Stämmen des Genotyps B hatten alle im Vergleich zu *Dumas* die typischen Marker mit Cytosin an den Positionen 33.722, 33.725 und 33.728 (ORF 21), Adenin an 66.288 (ORF 37) und Thymin im Nt 87.841 im ORF 50. Der Stamm 578/03 wurde unter Vorbehalt ebenfalls als Genotyp B klassifiziert, jedoch konnten die ORF 1 und 21 nicht sequenziert werden. Dem bereits beschriebenen Subgenotypen B1 (Philipps 2007) wurden die Stämme 78/84 und 12/04 zugeordnet. Das genetische Profil dieser Stämme umfasst im Vergleich zum Genotyp B Basenaustausche an den Positionen 762 in ORF 1 („still“), 33.654 im ORF 21 (Methionin>Isoleucin) und 95.319 im ORF 54 („still“). Im Rahmen dieser Studie wurden weitere SNP bei Genotyp-B-Stämmen nachgewiesen, so dass zusätzlich die Subtypen B2-B6 unterschieden wurden. Das Isolat 1715/03 mit dem Subgenotypen B2 wies eine Punktmutation im Nt 33.540 (Valin>Isoleucin) auf. Das Patientenmaterial 1565/06 wurde als Genotyp B3 eingestuft. Es zeichnete sich durch eine Mutation an Position 33.563 mit Änderung der AS-Struktur im ORF 21 aus (Methionin>Valin). Die Sequenzierung der ORF 37 und 60 gelang nicht. Das Isolat 405/07, klassifiziert als Subgenotyp B4, zeichnete sich durch eine stille Mutation im Nt 95.226 aus. Der Virusstamm 1177/06 als Vertreter von B5 teilt mit allen untersuchten Typ A-Stämmen die Substitution an 95.300 (C>T) mit einer Änderung der AS-Struktur von Glycin zu Serin. Das Isolat 52/07 wurde als Subgenotyp B6 eingeordnet. Für ihn führte ein SNP im Nt 626 des ORF 1 zu einer Veränderung der AS-Struktur (Valin>Alanin).

- **Stämme des Genotyps A**

Von den 20 gefundenen Viren vom Genotyp A wurden 13 dem bereits beschriebenen Subgenotypen A1 zugeordnet (Philipps 2007). A1 ist im Vergleich zu *Dumas* gekennzeichnet durch Cytosin in den Nt 789 bis 791 des ORF 1, Cytosin an den Positionen 33.722, 33.725 und 33.728 im ORF 21, Thymin im Nt 87.841 des ORF 50, Cytosin im Nt 95.241, Thymin im Nt 95.300, Cytosin im Nt 95.333 des ORF 54 sowie Adenin im Nt 101.464 von ORF 60. Aufgrund weiterer SNP wurden einige Typ-A-Stämme als neue Subgenotypen A3, A4 und A5 klassifiziert. Die Stämme mit den Labornummern 413/00, 463/00, 1566/06 und 1730/06 wurden dem Subgenotyp A3 zugeordnet. Ihnen fehlt im Vergleich zu A1 das SNP an Position 95.333. Sie besitzen dort wie *Dumas* Thymin. Der Virusstamm mit der Labornummer 60/06 konnte als Subgenotyp A4 identifiziert werden. Er hat im Gegensatz zu A1 ein zusätzliches SNP an Position 66.288 (Arginin>Lysin). Die beiden Virusisolate 445/07 und 446/07 wurden als Subtyp A5 eingeordnet. Sie unterscheiden sich an Position 33.646 (Glycin>Glutamat) und 95.333 von A1.

- **Stämme mit nicht genau definiertem Genotyp**

Der Stamm 535/04 (Varizellen, zweijähriger Junge) besitzt Merkmale sowohl des Genotyps B als auch des Genotyps C. Der Leserahmen 21 präsentiert die für B-Stämme typische Konstellation mit Cytosin an den Positionen 33.722, 33.725 und 33.728. Im Gegensatz dazu entsprechen die ORF 37 und 50 komplett dem Genotyp C. Die ORF 54 und 60 lassen keine Unterscheidung zwischen den Genotypen B und C zu, da sie identische genetische Marker enthalten. Aufgrund dieser Befunde wurde der Stamm 535/04 als mögliche B/C-Rekombinante eingestuft. Allerdings konnte er nicht in die phylogenetische Analyse aufgenommen werden, da eine Sequenzierung des ORF 1 nicht möglich war.

Das Isolat 1820/06 (Varizellen, dreijähriger Junge) vereint Merkmale der Genotypen A, B und C. ORF 1 und ORF 60 zeigen die Marker des Genotyps A. Die sequenzierten Abschnitte der ORF 21 und 50 sind identisch mit A- und B-Stämmen. ORF 37 vereint genetische Merkmale der Genotypen A und C, und ORF 54 besitzt die Marker von Genotyp B- und C-Stämmen. Die phylogenetische Analyse zeigt den Stamm 1820/06 zwischen den Genotypen A und B, was auf eine mögliche Rekombination hinweist.

Tab. 20: VZV-Genotypen und Subgenotypen bei Patienten mit Varizellen oder Zoster

Übersicht über die in dieser Arbeit sowie die in der von Philipps (2007) charakterisierten Genotypen und Subgenotypen der einbezogenen VZV-Stämme. Bezeichnungen nach Barrett-Muir et al. (2003). Nukleotide, die dem Referenzstamm *Dumas* entsprechen, sind **grün** unterlegt. Nukleotide, die bei *pOka* zu finden sind, werden **blau** dargestellt. **Rot** sind solche Substitutionen unterlegt, die weder in den DNA-Sequenzen von *pOka* noch in denen von *Dumas* zu finden sind. **Heller** Untergrund bedeutet, dass die Nukleotide mit beiden Referenzstämmen übereinstimmen. **Schwarz** markierte Bereiche konnten nicht sequenziert werden.

Lfd. Nr.	ORF	1							21							37		50	54							60	
	Position / Genotyp	626	648	685	762	789	790	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319	95333	95339	101464
1	Dumas	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	T	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C
2	pOka	A	A	A	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	C	T	T	C	C
3	C	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C
4	C1*	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	T	C
5	C2*	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	T	C	T	T	G	C	T	T	C	C
6	C3*	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	T	C	T	T	T	C	T	T	C	C
7	C4	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	T	C	T	T	T	C
8	C5	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	G	G	C	C	T	T	T	C	T	T	C	C
9	C6	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	T	C	T	T	C	C
10	C7	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	C	T	G	C	T	T	C	C
11	B	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C
12	B1*	A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	C	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	G	T	C	C
13	B2	A	A	G	G	T	T	T	A	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C
14	B3	A	A	G	G	T	T	T	G	T	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C	
15	B4	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	G	T	G	C	T	T	C	C
16	B5	A	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	C	G	T	T	T	C	

Fortsetzung Tab. 20

Lfd. Nr.	ORF	1							21							37		50	54							60	
	Position / Genotyp	626	648	685	762	789	790	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319	95333	95339	101464
17	B6	G	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C
18	A1*	A	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A
19	A2*	A	C	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	T	C	A
20	A3	A	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	T	C	A
21	A4	A	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A
22	A5	A	A	G	G	C	C	C	G	G	A	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	T	C	A
23	A/B/C?	A	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	T	G	C	T	T	C	A
24	B/C?								G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C

* Die Subgenotypen C1, C2, C3, B1, A1 und A2 wurden in Anlehnung an eine frühere Arbeit definiert (Philipps 2007).

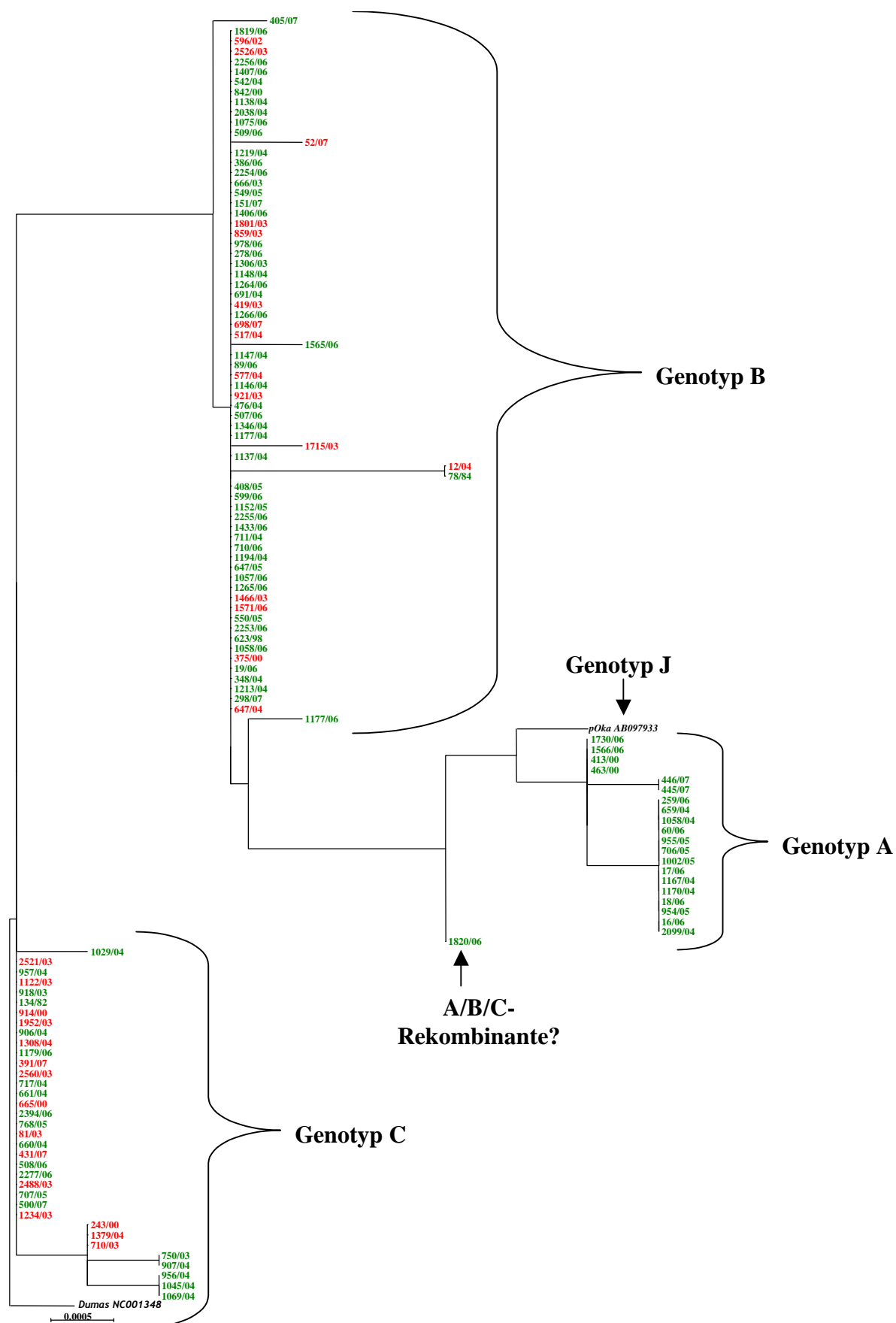


Abb. 9: Zusammenfassung der analysierten VZV-Stämme in einem phylogenetischen Stammbaum unter Einbeziehung der ORF 1, 21, 50 und 54

Grün: Patientensträmme mit Varizellen, Rot: Patientensträmme mit Zoster

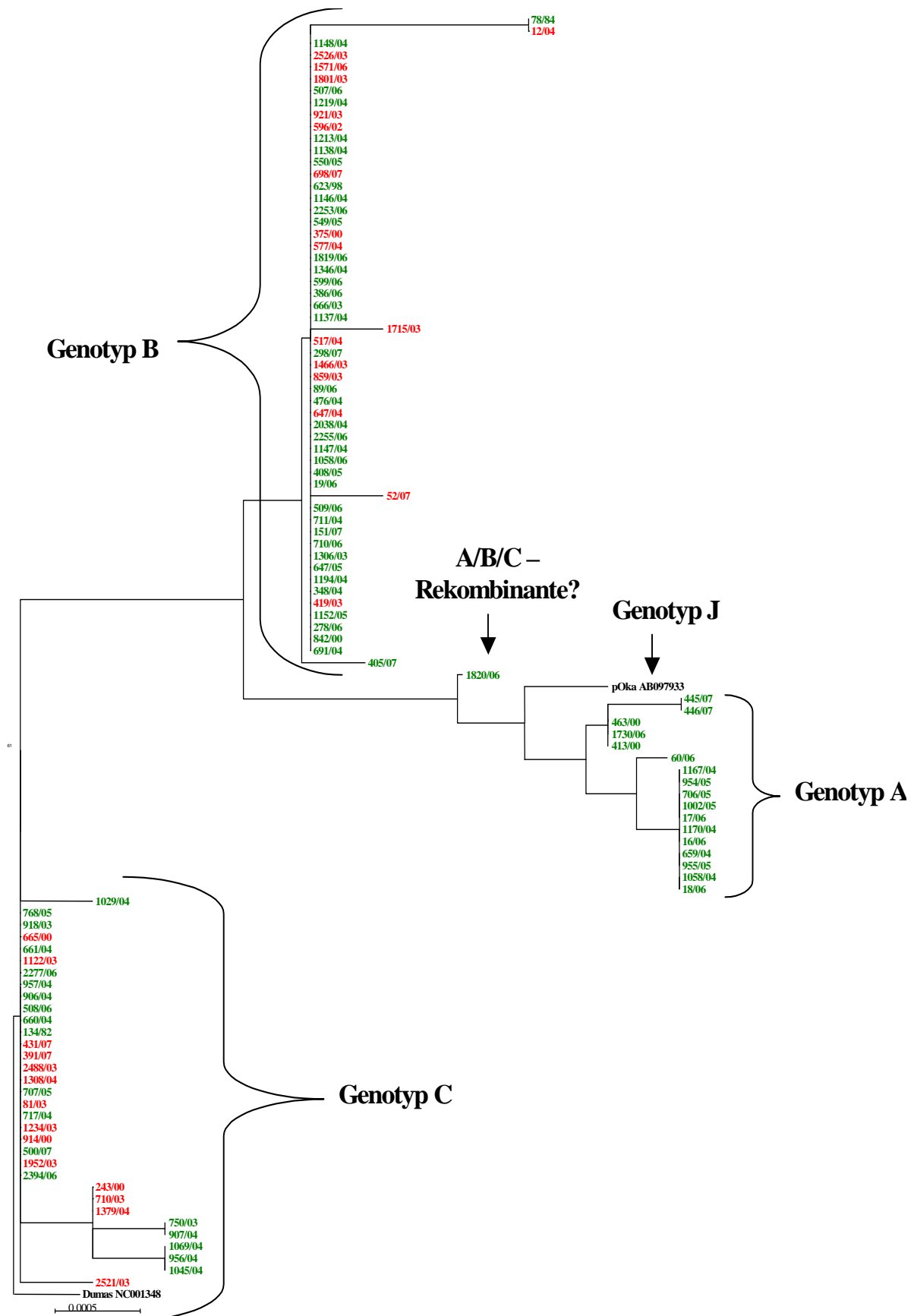


Abb. 10: Zusammenfassung der analysierten VZV-Stämme in einem phylogenetischen Stammbaum unter Einbeziehung der ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60

Grün: Patientenstämme mit Varizellen, Rot: Patientenstämme mit Zoster

4.4.4 Zuordnung der Varicella-Zoster-Virus-Genotypen zur klinischen Diagnose

- Materialien und Isolate von Varizellen-Patienten

Von den 96 untersuchten Stämmen der Patienten mit Varizellen (Tab. 21) wurden 20 Stämme dem **Genotyp C** zugeordnet. In dieser Gruppe fanden sich zwei Vertreter des Subgenotyps C4, drei von C5 und ein Vertreter des Subgenotyps C7. Von diesen 20 Patienten zeigten 18 den normalen Verlauf natürlicher Varizellen. Ein Patient, dessen Stamm (134/82) als Genotyp C klassifiziert wurde, entwickelte Varizellen mit tödlichem Verlauf. Ein weiterer Patient erkrankte an Varizellen nach Impfung. Sein Stamm (1179/06) zeigte die genetischen Charakteristika des Genotyps C.

54 Stämme der 96 Patienten mit Varizellen wurden als **Genotyp B** eingestuft. Von ihnen stammten 52 von Varizellen mit normalem Verlauf. Eine Patientin zeigte superinfizierte Varizellenbläschen. Ihr Stamm (408/05) wurde als Genotyp B identifiziert. Der Stamm 19/06 eines Patienten mit atypischem Verlauf konnte ebenfalls als Genotyp B identifiziert werden. Die Subgenotypen B1, B3, B4 und B5 waren jeweils einmal bei den Patienten mit regelhaftem Verlauf vertreten.

Unter den 20 als **Genotyp A** charakterisierten Varizellen-Stämmen fanden sich 13 vom Subgenotyp A1, vier vom Subgenotyp A3, einer vom Subgenotyp A4 sowie zwei Stämme vom Subgenotypen A5. Bis auf einen A3-Stamm hatten alle Virusstämme bei den Patienten einen normalen Krankheitsverlauf der Varizellen ausgelöst. Der Stamm 1566/03, der bei einem einjährigen männlichen Säugling einen schweren Krankheitsverlauf verursacht hatte, konnte als Subgenotyp A3 identifiziert werden.

Die beiden Stämme 535/04 und 1820/06 wurden als mögliche B/C- bzw. A/B/C-Rekombinanten eingestuft. Die Erkrankung zeigte bei beiden Patienten einen normalen Verlauf.

- Materialien und Isolate von Zoster-Patienten

Unter den 34 Stämmen (Tab. 21), die bei den Patienten einen Zoster hervorgerufen hatten, wurden 17 als VZV-Stämme vom Genotyp C identifiziert. Dabei wurde ein Stamm als Subgenotyp C2, und drei Stämme wurden als Subgenotyp C6 klassifiziert. Der Krankheitsverlauf war bei allen 17 Zoster-Patienten regelhaft.

Die restlichen 17 Virusstämme wurden als Genotyp B eingestuft. Jeweils einer dieser Stämme gehörte zum Subgenotyp B1, B2 und B6. Bei diesen 17 Materialien wurde der Verlauf der Erkrankung ebenfalls als normal eingestuft.

Es wurde kein Stamm vom Genotyp A oder eine mögliche Rekombinante innerhalb der Zoster-Patienten nachgewiesen. Die nachfolgende Tab. 21 gibt eine Übersicht über die Zuordnung der Genotypen zur klinischen Diagnose.

Tab. 21: Zuordnung der VZV-Genotypen zur klinischen Diagnose

	VZV-Stämme des Genotyps C						VZV-Stämme des Genotyps B								VZV-Stämme des Genotyps A				Potentielle Rekombinanten	
	C	C2	C4	C5	C6	C7	B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	A1	A3	A4	A5	A/B/C?	B/C?	
Varizellen (n=96)	14	0	2	3	0	1	50	1	0	1	1	1	0	13	4	1	2	1	1	
Normaler Verlauf	12		2	3		1	48	1		1	1	1		13	3	1	2	1	1	
Schwerer Verlauf															1					
Atypischer Verlauf							1													
Superinfektion							1													
Tödlicher Verlauf	1																			
Nach Impfung	1																			
Gesamtzahl	20						54								20				2	
Zoster (n=34) *	13	1	0	0	3	0	14	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Gesamtzahl	17						17								0				0	

* Der Verlauf der Zostererkrankungen war jeweils regelhaft.

4.4.5 Statistische Auswertung der Genotypisierungsergebnisse

Die Ergebnisse der statistischen Analyse der VZV-Hauptgenotypen in den Patientengruppen „Varizellen“ und „Zoster“ mittels eines Vierfeldertests sind in der Tabelle 22 zusammengefasst. Die detaillierten Berechnungen sind im Anhang auf den Seiten 100 und 101 aufgeführt. Da die Stämme 535/04 und 1820/06 nicht eindeutig einem Genotyp zuzuordnen waren, wurden sie für die Berechnungen nicht berücksichtigt.

Tab. 22 : Verteilung der VZV-Genotypen bei den Patienten mit Varizellen und Zoster

	Varizellen	Zoster	Signifikanz
Genotyp C	20	17	signifikant mit $p < 0,05$
Genotyp B	54	17	nicht signifikant mit $p > 0,05$
Genotyp A	20	0	signifikant mit $p < 0,05$
Gesamtzahl	94	34	

Genotyp C kommt bei Zoster signifikant häufiger vor als bei Varizellen ($p < 0,05$). Hinsichtlich der Verteilung des Genotyps B gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der Varizellen- und Zoster-Patienten ($p > 0,05$). VZV-Stämme des Genotyps A sind bei Varizellen signifikant häufiger zu finden als bei Zoster ($p < 0,05$).

5 Diskussion

5.1 Notwendigkeit einer Surveillance zirkulierender Varicella-Zoster-Virus-Genotypen

Mit der Einführung der allgemeinen Varizellenschutzimpfung 2004 auf der Basis eines Lebendimpfstoffes durch die Empfehlung der STIKO besteht in Deutschland die Notwendigkeit der Überwachung zirkulierender VZV-Genotypen. Folgende Gründe sind dabei zu berücksichtigen:

Das Impfvirus ist in der Lage, in seltenen Fällen Impf- bzw. Durchbruchsvarizellen oder einen Zoster auszulösen (Gershon 2001, Sauerbrei et al. 2004b, Tsolia et al. 1990). Bisherige Erkenntnisse gehen davon aus, dass der attenuierte Lebendimpfstoff zur Etablierung einer latenten Infektion fähig ist. Als Folge einer exogenen Zweitinfektion mit einem VZV-Wildtyp-Stamm besteht trotz der hohen genetischen Konstanz der Viren die Möglichkeit einer Rekombination zwischen Wildtyp- und Impftyp-Virusstämmen (Barrett-Muir et al. 2001, Takayama et al. 1996). Die Entstehung von Rekombinanten ist prinzipiell auch bei Infektionen mit zwei verschiedenen Wildtyp-Stämmen möglich (Quinlivan und Breuer 2006). Bei Varizellen oder Zoster nach Impfung sollte in jedem Fall eine genetische Charakterisierung des Krankheitserregers erfolgen. Es stellt sich in erster Linie die Frage, ob das Impfvirus selbst oder ein Wildtyp-Virus die Erkrankung auslöste. Methode der Wahl ist die Bestimmung des RFLP im ORF 62 unter Verwendung des Restriktionsenzym *SmaI*, mit dem die Frage zuverlässig beantwortet werden kann (Loparev et al. 2000, Sauerbrei et al. 2003). In bestimmten Erkrankungsfällen, beispielsweise bei schweren Verläufen, ist es sinnvoll, den Genotyp des VZV-Stammes zu identifizieren. Bislang gibt es zwar keine gesicherten Hinweise darauf, ob bestimmte Varianten mit schwereren Verläufen von Varizellen oder Zoster assoziiert sind. Allerdings wurde aufgrund einzelner Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen Mutationen des Virusgenoms im ORF 68 und einer Veränderung der Erregereigenschaften postuliert. Mutationen im ORF 68, das für das Glykoprotein E kodiert, können mit einer schnelleren Virusausbreitung in der Zellkultur und in immungestörten Mäusen verbunden sein (Tipples et al. 2002). Darüber hinaus wurde auch von einem VZV-Stamm mit Mutationen im ORF 68 berichtet, der mit dem letalen Ausgang von Varizellen assoziiert war (Natoli et al. 2006). Zusammenfassend ist eine Überwachung zirkulierender VZV-Genotypen nach Einführung der allgemeinen Varizellenimpfung vor

allem erforderlich, um mögliche Rekombinationsereignisse zwischen Impftyp- und Wildtyp-VZV-Stämmen auszuschließen bzw. zu dokumentieren und die Prävalenz rezidivierender Infektionen durch das Impftyp-Virus zu ermitteln.

5.2 Genotypisierungsmethoden verschiedener Arbeitsgruppen im Vergleich

In ersten Studien zur Epidemiologie der VZV-Genotypen wurden Restriktionsenzymanalysen mit *PstI* (ORF 38), *BglI* (ORF 54), und *SmaI* (ORF 62) eingesetzt (LaRussa et al. 1992, Loparev et al. 2000, Sauerbrei et al. 2003, Quinlivan et al. 2002). Damit gelang die Unterscheidung zwischen europäischen, nordamerikanischen, afrikanisch/asiatischen sowie Oka-ähnlichen Wildtyp- und *vOka*-Stämmen (Tab. 23). In einer ersten großen deutschen Studie wurden 177 Materialien von Varizellen oder Zoster unter Einbeziehung des RFLP der ORF 38, 54 und 62 untersucht (Sauerbrei und Wutzler 2007a). Im Ergebnis wurden zu 78% europäische Wildtyp-Stämme nachgewiesen (*PstI*⁺, *BglI*, *SmaI*), die den Genotypen B und C entsprechen. Im RFLP-Muster dieser Stämme finden sich eine Schnittstelle für *PstI* im ORF 38 (*PstI*⁺) und keine Schnittstellen für *BglI* und *SmaI* in den ORF 54 und 62 (*BglI*, *SmaI*). Bei den übrigen 22% handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um VZV-Stämme des afrikanisch/asiatischen Genotyps A mit vorhandenen Schnittstellen für *PstI* sowie *BglI* und nicht für *SmaI* (*PstI*⁺, *BglI*⁺, *SmaI*). Die RFLP-Analyse kann innerhalb weniger Stunden durchgeführt werden und erfordert im Vergleich zur DNA-Sequenzierung einen bedeutend geringeren Arbeitsaufwand. Sie ist daher besonders für große epidemiologische Studien geeignet. Von den 177 charakterisierten Proben der erwähnten Studie kann eine repräsentative epidemiologische Übersicht erwartet werden (Sauerbrei und Wutzler 2007a). Aufgrund dieser Ergebnisse muss von einer zunehmenden Anzahl an Genotyp A-Stämmen in Deutschland bzw. zumindest in der einbezogenen Thüringer Region ausgegangen werden. Die eingesetzte Methodik gestattet jedoch keine zweifelsfreie Zuordnung von VZV-Stämmen zu bestimmten Genotypen. Zur präzisen Einordnung des Genotyps und zur Erkennung möglicher Varianten bzw. Rekombinanten muss deshalb die Sequenzierung größerer DNA-Abschnitte herangezogen werden, mit der sich derzeit zahlreiche internationale Arbeitsgruppen beschäftigen.

Tab. 23: RFLP von VZV-Stämmen (Sauerbrei und Wutzler 2007a)

VZV-Genotypen	ORF 38	ORF 54	ORF 62
Europäische Wildtyp-Stämme (Genotypen B und C)	<i>Pst</i> I ⁺	<i>Bgl</i> I ⁻	<i>Sma</i> I ⁻
Afrikanisch/Asiatische Wildtyp-Stämme (Genotyp A)	<i>Pst</i> I ⁺	<i>Bgl</i> I ⁺	<i>Sma</i> I ⁻
Japanische Wildtyp-Stämme (<i>pOka</i>)	<i>Pst</i> I ⁻	<i>Bgl</i> I ⁺	<i>Sma</i> I ⁻
Impftyp-Stamm (<i>vOka</i>)	<i>Pst</i> I ⁻	<i>Bgl</i> I ⁺	<i>Sma</i> I ⁺

Zuverlässige moderne Verfahren zur Genotypisierung des VZV (siehe auch Tab. 2, Seite 18) stützen sich auf den Nachweis von SNP mittels Sequenzierung verschiedener Abschnitte des VZV-Genoms. Von den Verfahren muss neben einer Klassifizierung der VZV-Wild-Genotypen eine sichere Unterscheidung von Impf- und Wildtyp-Viren sowie ein vertretbarer Aufwand gefordert werden.

Barrett-Muir et al. (2003) entwickelten die Scattered-ORF-Methode, die auf der Analyse von Fragmenten der ORF 1, 21, 50 und 54 basiert. In ihrer Arbeit beschrieben die britischen Forscher die regional unterschiedlich verteilten Genotypen A, B, C und J (siehe Tab. 24, Seite 60). VZV-Stämme aus tropischen Regionen sind mehrheitlich vom Genotyp A, in europäischen und nordamerikanischen Ländern dominieren die Genotypen B und C. Isolate mit den genetischen Markern des Genotyps J finden sich fast ausschließlich in Japan. In ihrer Studie wiesen Barrett-Muir et al. (2003) darauf hin, dass sich mit der Immigrationsbewegung aus tropischen Regionen nach Europa bzw. Nordamerika auch die Proportionen der VZV-Stämme untereinander in den entsprechenden Regionen verschieben können. Ein vermehrtes Auftreten von Genotyp A-Stämmen bei Zoster-Patienten sei beispielsweise für die nächsten Jahre in Großbritannien zu erwarten. Die Scattered-ORF-Methode von Barrett-Muir et al. (2003) liefert zuverlässige Ergebnisse zur Klassifizierung des VZV in vier Hauptgenotypen einschließlich der Unterscheidung von Impf- und Wildtyp-Stämmen. Die Stämme *pOka* und *vOka* können voneinander unterschieden werden. Mit dieser Methode gelingt allerdings keine Unterscheidung der Genotypen J und M2 (Loparev et al. 2007a, Loparev et al. 2007b). Da nur vier DNA-Fragmente in die Sequenzierung einbezogen werden, können Subgenotypen und eventuelle Rekombinanten nicht vollständig erkannt werden. Durch die notwendige Amplifizierung mehrerer DNA-Fragmente besteht ein relativ hoher Bedarf an viraler DNA.

Eine zweite Methode zur VZV-Genotypisierung wurde durch die Arbeitsgruppe um Loparev et al. (2004, 2007a, 2007b) entwickelt (siehe Tab. 24, Seite 60). Die nordamerikanischen Forscher stützten ihr Verfahren zur Genotypisierung zunächst auf die Sequenzierung eines

447 Bp langen Fragments aus dem ORF 22. Als spätere Ergänzung folgte die Einbeziehung eines weiteren Fragments entweder aus ORF 21 oder aus ORF 50. Die Einteilung der VZV-Stämme in die Genotypen E1, E2 (C, B nach der Scattered-ORF-Methode), J (J) und M (M1, M2) wurde auf der Grundlage von SNP in den genannten genetischen Regionen vorgenommen. Alle gefundenen Genotypen bis auf die kürzlich beschriebenen Genotypen M3 und M4 wurden bisher durch Ganzgenomcharakterisierung bestätigt (Peters et al. 2006). Loparev et al. (2004) können zwischen den Genotypen J und M2 unterscheiden, was nicht mit der Scattered-ORF-Methode nach Barrett-Muir et al. (2003) gelingt. Das Verfahren von Loparev et al. (2004, 2007a, 2007b) kann zwar zur zuverlässigen Unterscheidung der Hauptgenotypen der VZV-Stämme genutzt werden, es ist aber nicht in der Lage, Wild- und Impfstämme einschließlich *vOka* und *pOka* sicher zu differenzieren. Dazu bedarf es zusätzlich der Restriktionsenzymanalyse des ORF 62 (Loparev et al. 2000). Die kürzlich beschriebenen neuen Genotypen M3 und M4 wurden bisher nicht durch andere Arbeitsgruppen differenziert und sind bislang auch nicht mittels Gesamtgenomanalyse bestätigt (Loparev et al. 2007b, Loparev et al. 2004). Der zeitliche und materielle Aufwand ist relativ gering, da zur Abgrenzung der Hauptgenotypen des VZV zunächst nur zwei Fragmente sequenziert werden müssen. Allerdings ist es erforderlich, dass zur genaueren Einteilung sowie der Charakterisierung von Subgenotypen und Rekombinanten weitere Fragmente untersucht werden. Dies erfordert einen höheren Bedarf an Zeit und viraler DNA, was mit der Scattered-ORF-Methode vergleichbar ist.

Faga et al. (2001) und Wagenaar et al. (2003) sequenzierten Fragmente der ORF 31, 37, 60, 62, 67 und 68 (siehe Tab. 24, *Glykoprotein/IE62-Methode*, Seite 60) in Anlehnung an die Ergebnisse der Ganzgenomcharakterisierung von Peters et al. (2006). Ihre Klassifizierung der VZV-Stämme erfolgte in die ebenfalls regional verteilten Genotypen A (entsprechend der Scattered-ORF-Methode: C), B (J), C (J), D (B). Die Glykoprotein/IE62-Methode unterscheidet sicher zwischen Impf- und Wildtyp-Viren. Die Differenzierung von *vOka* und *pOka* ist auf der Grundlage der Charakterisierung von ORF 62 möglich. Mit der Methode wurden jedoch Genotyp A-Stämme (Scattered-ORF-Methode) bislang nicht identifiziert. Infolge der Einbeziehung von sechs ORF besteht ein hoher zeitlicher Aufwand sowie ein hoher Bedarf an viraler DNA.

Eine weitere Genotypisierungsmethode wurde von Schmidt-Chanasit et al. (2007) entwickelt (siehe Tab. 24, Seite 60). Basierend auf der genetischen Charakterisierung von Fragmenten der ORF 51, 52, 53, 56, 57 und 58 klassifizierten die deutschen Forscher VZV-Stämme in Anlehnung an Erkenntnisse von Norberg et al. (2006). Die Bezeichnungen der Genotypen

wurden von Faga et al. (2001) und Wagenaar et al. (2003) übernommen. Das Verfahren wurde durch Schmidt-Chanasit et al. (2007) in Deutschland bei 42 Stämmen angewendet, die nahezu ausschließlich von Patienten mit Zoster gewonnen worden waren. Im Ergebnis konnten nur VZV-Stämme der Genotypen B und C (Scattered-ORF-Methode) analysiert werden. VZV-Stämme vom Genotyp A wurden mit diesem Verfahren bislang nicht definiert. Eine Unterscheidung von Wild- und Impftyp-Viren ist nicht zuverlässig möglich. Die von Schmidt-Chanasit et al. (2007) beschriebenen Varianten von VZV-Stämmen der Genotypen B und C sind ohne Ganzgenomanalyse nicht mit den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Subgenotypen vergleichbar. Der Aufwand ist durch die Einbeziehung von sechs ORF in die Sequenzierung vergleichsweise höher als bei der Scattered-ORF-Methode.

Das aufwendigste, aber präziseste Verfahren zur VZV-Genotypisierung ist die Gesamtgenomanalyse (Peters et al. 2006). Die Arbeitsgruppe übernahm die Nomenklatur der Glykoprotein/IE62-Methode. Peters et al. (2006) gewannen durch die Sequenzierung des kompletten Genoms von elf Stämmen neue Erkenntnisse über die Genetik des VZV und seine evolutionären Ursprünge. Die technischen und zeitlichen Anforderungen sind enorm. Für eine epidemiologische Studie ist der Ansatz damit ungeeignet. Dabei ist die Gesamtgenomanalyse jedoch nach wie vor die einzige Möglichkeit, um eine Rekombination zwischen verschiedenen Genotypen des VZV zweifelsfrei zu belegen.

In einem Vergleich aller bislang etablierten Methoden (siehe Tab. 24) ist den Verfahren nach Schmidt-Chanasit et al. (2007), Faga et al. (2001) und Wagenaar et al. (2003) sowie der Scattered-ORF-Methode von Barrett-Muir et al. (2003) gemeinsam, dass ein hoher Bedarf an Virusmaterial sowie ein großer zeitlicher und materieller Aufwand besteht. Die Genotypisierung nach Loparev et al. (2004, 2007a, 2007b) ist in beiden Punkten überlegen. Mit allen Methoden, mit Ausnahme der Gesamtgenomcharakterisierung, können Subgenotypen und Rekombinanten nicht zuverlässig voneinander abgegrenzt werden.

Tab. 24: Vergleich verschiedener Verfahren zur Genotypisierung des VZV

	Scattered-ORF-Methode (Barrett-Muir et al. 2003)	Glykoprotein/IE62-Methode (Faga et al. 2001, Wagenaar et al. 2003)	Verfahren nach Loparev et al. (2007a)	Verfahren nach Schmidt-Chanasit et al. (2007)	Modifizierte Scattered-ORF-Methode in dieser Arbeit
Sequenzierte DNA-Fragmente	4	6	1-3	6	6
Differenzierte Hauptgenotypen	4	4	5	4	4
Vorteile	Unterscheidung von vier Hauptgenotypen Differenzierung von Wild- und Impftyp-Viren ist möglich	Unterscheidung von vier Hauptgenotypen Differenzierung von J und M2 Differenzierung von Wild- und Impftyp-Viren ist möglich	Geringster Aufwand Unterscheidung von fünf Hauptgenotypen Differenzierung von J und M2	Unterscheidung von vier Hauptgenotypen ist möglich	Unterscheidung von vier Hauptgenotypen Erfassen zahlreicher Subgenotypen und Rekombinanten Differenzierung von Wild- und Impftyp-Viren ist möglich
Nachteile	Aufwendig Differenzierung zwischen J und M2 ist nicht möglich Mögliche Rekombinanten werden nicht zweifelsfrei differenziert	Aufwendig Bislang kein Nachweis von Genotyp A-Stämmen Mögliche Rekombinanten werden nicht zweifelsfrei identifiziert	Differenzierung von Wild- und Impftyp-Viren ist nicht möglich Mögliche Rekombinanten werden nicht zweifelsfrei identifiziert	Aufwendig Keine zuverlässige Differenzierung von Wild- und Impftyp-Viren Bislang kein Nachweis von Genotyp A-Stämmen Mögliche Rekombinanten und Subgenotypen werden nicht zweifelsfrei identifiziert	Aufwendig Differenzierung zwischen J und M2 ist nicht möglich Mögliche Rekombinanten und Subgenotypen müssen mittels Ganzgenom-analyse bestätigt werden

In der vorliegenden Arbeit wurde die Scattered-ORF-Methode von Barrett-Muir et al. (2003) weiterentwickelt, um eine umfassendere genetische Differenzierung der einbezogenen VZV-Stämme zu erreichen (siehe Tab. 24, „Modifizierte Scattered-ORF-Methode“). Mit der Einbeziehung von DNA-Fragmenten der ORF 37 und 60 auf Basis der Erkenntnisse von Faga et al. (2001) und Wagenaar et al. (2003) wurde eine zusätzliche Erfassung von Subgenotypen und möglichen Rekombinanten erreicht. Die zusätzliche Einbeziehung der Analyse des RFLP im ORF 62 bestätigte, dass eine zuverlässige Differenzierung zwischen Wild- und Impftyp-Viren möglich ist. Mithilfe der Sequenzierung von Fragmenten der ORF 1, 21, 37, 50, 54 und

60 wurden die Hauptgenotypen A, B und C inklusive jeweils mehrerer Subgenotypen sowie zwei potentieller Rekombinanten nachgewiesen. Für die Zukunft kann mit einer Einbeziehung des ORF 22 die Erfassung des Genotyps M2 und eventuell weiterer M-Genotypen von Loparev et al. (2004, 2007a, 2007b) erfolgen. Der materielle und zeitliche Aufwand für die Sequenzierung von sechs ORF und die eventuelle Einbeziehung eines RFLP ist für eine epidemiologische Studie relativ hoch. Das Verfahren erfordert zumindest 22 µl virushaltiges DNA-Material für die insgesamt sieben Amplifikationen bei erfolgreichem Nachweis aller Fragmente durch jeweils eine PCR. Bei fehlgeschlagener PCR wurde die Reamplifikation zunächst mit 4 µl und im dritten Anlauf mit 6 µl Virusmaterial wiederholt. Damit wurden in der vorliegenden Arbeit für die PCR der Fragmente 1, 21, 37, 50, 54 und 60 maximal 72 µl DNA verbraucht. Eine Amplifikation von ORF 62 erforderte zusätzliche 10 µl. Die PCR zur Amplifikation von ORF 62 wurde etwa bei der Hälfte der Stämme zweimal und bei ca. 10% dreimal versucht. Aus den nicht kultivierten Originalmaterialien konnten maximal 100 µl virushaltige DNA gewonnen werden, von denen nach Ablauf vorangehender Untersuchungen ca. 85 µl für die Amplifikation aller Fragmente eingesetzt werden konnten. Deshalb war die Menge DNA-haltigen Virusmaterials nicht immer ausreichend, wenn keine Kultivierung des VZV in der Zellkultur erfolgen konnte. Aus einigen Patientenmaterialien, bei denen es sich meist um Bläschenabstriche handelte, konnte wegen einer geringeren Menge an Bläscheninhalt in Abhängigkeit von der Materialabnahme relativ wenig DNA eluiert werden. Die besten Voraussetzungen für die Methode bietet daher die Kultivierung von VZV-Stämmen, so dass eine größere Menge an VZV-DNA im Vergleich zur Verwendung des Originalmaterials zur Verfügung steht (Philipps 2007). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass VZV-Stämme bis zur 16. Passage kultiviert werden können, ohne dass es zu Basenmutationen kommt (Sauerbrei et al. 2007). Ist keine Kultivierung des VZV möglich, muss die Charakterisierung zahlreicher Virusstämme auf die Sequenzierung der ORF 1, 21, 50 und 54 beschränkt bleiben. Damit ist ebenfalls eine Klassifizierung der Hauptgenotypen mit Ausnahme von M2 möglich (Barrett-Muir et al. 2003).

In den eigenen Untersuchungen gelang die Restriktionsenzymanalyse bei allen 13 angezüchteten Varizellen-Stämmen und bei acht von neun isolierten Zoster-Stämmen. Dagegen konnte die Analyse des RFLP des ORF 62 nur bei 61 von 83 (73%) Originalproben der Varizellen-Patienten und bei 17 von 25 (68%) der Originalproben der Zoster-Patienten ausgewertet werden. Die Sequenzierung der Fragmente aller sechs ORF gelang bei 12 der 13 (93%) kultivierten Varizellen-Stämmen und bei allen neun kultivierten Zoster-Stämmen. Im Gegensatz dazu konnten nur bei 64 von 83 (77%) der nicht angezüchteten Varizellen-Stämme

bzw. bei 21 von 25 (84%) der nicht angezüchteten Zoster-Stämme die Fragmente aller sechs ORF sequenziert werden. Gründe für diese Differenzen bei der Charakterisierung von kultivierten bzw. nicht kultivierten VZV-Stämme sind vor allem in Unterschieden bezüglich der Menge der zur Verfügung stehenden viralen DNA zu suchen. Während von angezüchteten Stämmen praktisch unbegrenzte Mengen virushaltiger DNA isoliert werden können, ist diese Menge bei ausschließlicher Verwendung der Originalmaterialien begrenzt und nicht immer ausreichend. Die Materialien der nicht angezüchteten VZV-Stämme können zudem eine unterschiedliche Konzentration an viraler DNA aufweisen, was nicht experimentell überprüft wurde. Aus diesem Grunde kommt einer korrekten Materialentnahme sowie einem raschen Transport ins Labor eine große Bedeutung zu.

5.3 Genotypen des Varizella-Zoster-Virus in Deutschland

- VZV-Stämme vom Genotyp C

In der vorliegenden Studie wiesen insgesamt 37 von 130 (28%) Patientenmaterialien und Isolaten die genetischen Marker des Genotyps C auf. Es fanden sich 20 (21%) Stämme vom Genotyp C unter den Proben von Patienten mit Varizellen, bei den Proben von Zoster-Patienten 17 von 34 (50%). Damit sind VZV-Stämme des Genotyps C signifikant häufiger als Erreger des Zoster als von Varizellen zu finden (siehe Tab. 22, Seite 54). In der vergleichbaren Studie von Philipps (2007) zeigten 17 von 57 (30%) Varizellen-Patienten und 12 von 20 (60%) Zoster-Patienten und damit insgesamt 38% aller untersuchten Stämme typische SNP des Genotyps C. Die Patienten stammten wie in der vorliegenden Arbeit aus Thüringen. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studie von Philipps (2007) dürfte vor allem die kleinere Zahl an untersuchten Proben sein. Es kann angenommen werden, dass der reale Anteil zirkulierender Genotyp C-Stämme, das heißt solche, die bei der VZV-Primärinfektion nachgewiesen werden können, zwischen den ermittelten Werten von 20 und 30% liegt. Schmidt-Chanasit et al. (2007) wiesen unter 42 VZV-Stämmen, die vorwiegend von Zoster-Patienten gewonnen wurden, 14 (33%) vom Genotyp C nach. Die Proben stammten aus Frankfurt am Main und Rostock. Ein Vergleich mit den eigenen Ergebnissen der Stämme von Varizellen ist nicht sinnvoll, da bei einer Gesamtanzahl von sieben Varizellen-Patienten nicht von einem repräsentativen Querschnitt ausgegangen werden kann. Der Anteil von 33% an VZV-Stämmen des Genotyps C mehrheitlich von Zoster-Patienten

liegt unter dem der vorliegenden Arbeit. Verantwortlich für diese Unterschiede können zum einen die geringe Probandenzahl und zum anderen Unterschiede in der demographischen Zusammensetzung der untersuchten Population sein.

Innerhalb der Gruppe der Varizellen-Patienten sind VZV-Stämme vom Genotyp C mit einem Anteil von ca. 20% seltener als solche vom Genotyp B. Bei Virusreaktivierungen treten Stämme der beiden europäischen Genotypen C und B gleich häufig mit je etwa 50% auf. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit muss mit einer Verschiebung der Proportionen der aktuell zirkulierenden VZV-Stämme untereinander gerechnet werden. Stämme des Genotyps C waren in der Vergangenheit offenbar für ca. 50% der VZV-Primärinfektionen verantwortlich, wie die Untersuchungen an der Patientengruppe mit Zoster zeigten. Für die Zukunft ist dagegen mit einer prinzipiellen Abnahme von Stämmen des Genotyps C sowohl bei Patienten mit Varizellen als auch bei Patienten mit Zoster zu rechnen.

Die VZV-Stämme des Genotyps C besitzen innerhalb des sequenzierten Bereiches von insgesamt 2.698 Bp eine genetische Homogenität von 99,90 bis 99,96% mit dem Prototyp-Stamm *Dumas*. Die genetischen Unterschiede innerhalb des europäischen Genotyps C betrafen die ORF 37 und 54 sowie die NCR von ORF 21 (Tab. 20, Seite 48). Die Basenmutationen im Nt 95.226 (T>C) des ORF 54 und im Nt 33.927 (T>G) des ORF 21 wurden bisher noch nicht beschrieben. Die übrigen SNP in den Nt 66.350 (ORF 37), 95.262 und 95.339 (ORF 54) wurden bereits von Philipps (2007) analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Varianten der VZV-Stämme vom Genotyp C nachgewiesen. Die Subgenotypen C4 mit zwei, C5 mit drei Stämmen und C7 mit einem Stamm wurden bisher noch nicht dokumentiert. Ihr Nachweis gelang stets bei Patienten mit Varizellen. Bei den Zoster-Patienten wurden neben 13 Stämmen vom Genotyp C die bereits von Philipps (2007) bekannten Varianten C2 mit einem Stamm und C6 mit drei Stämmen nachgewiesen. Die Varianten der Zoster-Stämme unterscheiden sich vom Hauptgenotypen C jeweils nur durch ein SNP und besitzen damit eine genetische Homogenität von 99,93% zu *Dumas* im sequenzierten Bereich. Die Genotyp C-Varianten von Patienten mit Varizellen sind bis auf C7 im Vergleich zum Hauptgenotyp C durch jeweils ein SNP mehr gekennzeichnet. Damit sind sie zu 99,90% im sequenzierten Bereich zu *Dumas* genetisch homogen und unterscheiden sich etwas mehr von *Dumas* als die VZV-Stämme von Zoster-Patienten.

Die Basenaustausche der Stämme, die den Subgenotypen C2 (2521/03), C6 (243/00, 710/03 und 1379/04) und C7 (1029/04) zugeordnet wurden, können am ehesten durch Punktmutationen erklärt werden. Die drei Varianten des Genotyps C unterscheiden sich im

sequenzierten Bereich durch jeweils ein SNP von *Dumas*. Die Zoster-Stämme vom Subgenotyp C6 haben mit den Varizellen-Stämmen der Subgenotypen C4 und C5 jeweils einen Basenaustausch im Nt 95.262 des ORF 54 gemeinsam. Zusätzlich besitzen die VZV-Stämme vom Genotyp C4 (750/03, 907/04) und C5 (956/04, 1045/04, 1069/04) im Vergleich zu C6 (243/00, 710/03 und 1379/04) aber jeweils ein weiteres SNP (siehe Tab. 20, Seite 48). Die zusätzliche Mutation führt in der phylogenetischen Analyse (siehe Abb. 9 und 10, Seiten 50 und 51) zu einem größeren Abstand zu den Zoster-Stämmen vom Subgenotypen C6. Die Varianten C4 und C5 könnten damit vom Subgenotypen C6 abstammen. In diesem Falle wäre am ehesten eine Punktmutation als evolutionärer Mechanismus denkbar, da der Unterschied zum Subgenotypen und fraglichen Ahnenstamm C6 wiederum nur in einem SNP besteht. Der Verdacht eines solchen Verhältnisses von C4, C5 und C6 zueinander kann nur durch Ganzgenomanalyse erhärtet werden (Peters et al. 2006).

Die Arbeitsgruppe Schmidt-Chanasit et al. (2007) wies drei Varianten unter den 14 VZV-Stämmen vom Genotyp C nach. Diese können aber auf Basis der publizierten Daten nicht mit den Subgenotypen der vorliegenden Arbeit verglichen werden, da Fragmente anderer ORF zur genetischen Einordnung der VZV-Stämme herangezogen wurden. Die Forscher vermuteten ebenfalls Punktmutationen als Ursache der gefundenen genetischen Veränderungen (Schmidt-Chanasit et al. 2007).

- **VZV-Stämme vom Genotyp B**

Insgesamt zeigten 71 von 130 (55%) VZV-Stämmen die genetischen Marker des Genotyps B. Mit 54 von 96 (56%) Proben war der Genotyp B in der Gruppe der Varizellen-Patienten der häufigste nachgewiesene Genotyp. Innerhalb der Zoster-Patienten wurden 50% der untersuchten Stämme als Genotyp B charakterisiert. Durch die statistische Analyse wurde nachgewiesen, dass die Erreger in beiden Krankheitsgruppen nahezu gleich häufig vorkommen. Aufgrund der vorliegenden Daten muss der Genotyp B derzeit als der häufigste Erreger von Windpocken in Deutschland bzw. zumindest in Thüringen angesehen werden. In der Studie von Philipps (2007) enthielten 22 von 57 (39%) Varizellen-Patienten sowie 8 von 20 (40%) Zoster-Patienten und damit insgesamt 39% aller untersuchten Stämme typische SNP des Genotyps B. Ein Grund für die Unterschiede zur Studie von Philipps (2007) dürfte vor allem die kleinere Zahl untersuchter Proben sein. Es bleibt zu vermuten, dass der wirkliche Anteil der zur Zeit zirkulierenden Genotyp B-Stämme zwischen den ermittelten Werten von 39 und 55% liegt. Das Gleiche gilt auch für die Verteilung der Genotypen bei den

Patienten mit Zoster. Hier kann der reale Anteil der Genotyp B-Stämme auf 40 bis 50% geschätzt werden. Die bereits erwähnte deutsche RFLP-Studie zur VZV-Genotypisierung ergab einen Anteil von ca. 80% europäischer Stämme der Genotypen B und C bei Zoster und Varizellen (Sauerbrei und Wutzler 2007b). Die Daten der vorliegenden Arbeit weichen mit einem Anteil von 83% nur gering davon ab. Wie die eigenen Befunde demonstrieren, sind VZV-Stämme vom Genotyp B die aktuell am häufigsten zirkulierenden Wildtyp-Stämme. Virusreaktivierungen in Form von Zoster erfolgen dagegen etwa zur Hälfte mit Stämmen der Genotypen B und C. Wenn man davon ausgeht, dass sich alle VZV-Wildtyp-Stämme nach der Primärinfektion latent etablieren und später zum Zoster führen können, dann ist in den nächsten Jahrzehnten eine Dominanz von VZV-Stämmen des Genotyps B auch bei den Patienten mit Zoster zu erwarten. Ein Vergleich mit den Resultaten von Schmidt-Chanasit et al. (2007) kann auch hier nur unter Vorbehalt erfolgen, da in dieser Arbeit insgesamt 35 Proben von Zoster und nur sieben von Varizellen untersucht wurden. Schmidt-Chanasit et al. (2007) klassifizierten 28 von 42 VZV-Stämmen (67%) als Genotyp B. Diese Befunde stimmen insofern mit den eigenen überein, dass der Genotyp B derzeit der häufigste nachweisbare VZV-Genotyp in Deutschland ist.

Die VZV-Stämme des Genotyps B weisen innerhalb des über 2.698 Bp sequenzierten Bereiches eine genetische Homogenität von 99,70 bis 99,80% zum Referenzstamm *Dumas* auf. Die Unterschiede innerhalb des europäischen Genotyps B betreffen die ORF 1, 21, 37, 50 und 54. Die Punktmutationen in den Nt 626 (ORF 1), 33.540, 33.563 (ORF 21) sowie 95.226 und 95.300 (ORF 54) wurden bisher noch nicht beschrieben. Die übrigen SNP in den Nt 33.654, 33.722, 33.725, 33.728 (ORF 21) 87.841 (ORF 50) und 95.300 (ORF 54) sind bereits bekannt (Barrett-Muir et al. 2003, Philipps 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Varianten der VZV-Stämme vom Genotyp B nachgewiesen. Zwei Stämme vom Subgenotyp B1 waren bereits von Philipps (2007) nachgewiesen worden. Zwei weitere B1-Stämme wurden in dieser Arbeit identifiziert (78/84, 12/04). Die Variante B1 unterscheidet sich mit vier Basensubstitutionen und 99,70% genetischer Homogenität von allen B-Stämmen am stärksten von *Dumas*. Als Mechanismus für die Entstehung der Variante können Punktmutationen vermutet werden. Die vier B1-Stämme stammen von Varizellen- und Zoster-Patienten aus den Jahren 1984, 2004 und 2005 und sind damit epidemiologisch nicht verwandt. Die VZV-Stämme der Subgenotypen B2, B4 und B6 unterscheiden sich im sequenzierten Bereich durch jeweils eine Base vom Hauptgenotyp B. Auch diese Basenaustausche können am ehesten durch Punktmutation erklärt werden. Der nicht kultivierte VZV-Stamm 1565/06 wurde wegen des SNP (G>T) im Nt 33.564 als Genotyp B3

eingeordnet. Die Fragmente der ORF 37 und 60 konnten jedoch nicht sequenziert werden. Das gilt auch für ORF 60 beim VZV-Stamm 1177/06. Der Stamm wurde aufgrund eines SNP im Nt 95.241 (T>C) des ORF 54 als B5 klassifiziert. Da die Base in der genannten Position für VZV-Stämme vom Genotyp A typisch ist, ist aufgrund der phylogenetischen Analyse (siehe Abb. 9, Seite 50) eine Rekombination bei 1177/06 nicht vollständig auszuschließen. Da die ORF 37, 50 und 60 aber dem Genotyp B entsprechen und insbesondere im ORF 54 keine weiteren Substitutionen nachzuweisen waren, kann man den Basenaustausch mit hoher Wahrscheinlichkeit als Punktmutation werten.

Wie die Ergebnisse zeigen, weichen die VZV-Stämme vom Genotyp B im Vergleich zu den Genotyp C-Stämmen stärker vom Referenzstamm *Dumas* ab. Die nordamerikanische Forschergruppe um Loparev et al. (2007a) vermutete, dass die Genotyp B-Stämme durch Rekombination europäischer und tropischer bzw. japanischer Stämme entstanden sind: Die VZV-Stämme des Genotyps B besitzen SNP sowohl von Stämmen des Genotyps C in den ORF 1, 54 und 60 als auch von Stämmen des Genotyps A in den ORF 21 und 50 (siehe Tab. 20, Seite 48). Dazu passt, dass die genetische Homogenität der Genotyp B-Stämme zwischen jener der Genotyp C- und Genotyp A-Stämme liegt. Innerhalb des Genotyps B unterscheiden sich die Virusvarianten bis auf die zwei Stämme des Subgenotyps B1 jeweils nur in einem SNP. Es besteht kein Anhalt für eine phylogenetische Verwandtschaft (siehe Abb. 9 und 10, Seiten 50 und 51) der Subgenotypen untereinander, da die Varianten keine SNP miteinander teilen. Die Varianten unter den 28 VZV-Stämmen vom Genotyp B, die in der Studie von Schmidt-Chanasit et al. (2007) nachgewiesen wurden, können wegen der bereits genannten Gründe nicht mit denen der vorliegenden Arbeit verglichen werden.

- VZV-Stämme vom Genotyp A

Insgesamt zeigten 20 der 130 (13%) Patientenmaterialien und Isolate der vorliegenden Studie die genetischen Marker des Genotyps A. Diese 20 Stämme wurden allesamt aus Effloreszenzen von Patienten mit Varizellen gewonnen (21%). Unter den Patienten mit Zoster wurde kein Stamm vom Genotyp A nachgewiesen. VZV-Stämme des Genotyps A sind bei Patienten mit Varizellen damit statistisch signifikant häufiger als bei Patienten mit Zoster (siehe Tab. 22, Seite 54). In der Studie von Philipps (2007) wurden 17 von 54 (31%) VZV-Stämmen von Varizellen dem Genotyp A zugeordnet. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied ist wiederum in der geringeren Anzahl an Proben zu suchen. Das Fehlen von Genotyp A-Stämmen bei den Patienten mit Zoster stützt dagegen die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit. Der wahre Anteil an Genotyp A-Stämmen bei Varizellen kann auf 21 bis 31% geschätzt werden. Ein Vergleich mit den Ergebnissen von Schmidt-Chanasit et al. (2007) kann auch hier wegen der bereits genannten Gründe nur unter Vorbehalt erfolgen. Deren Befunde decken sich in folgender Hinsicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Es konnte kein Genotyp A-Stamm unter ihren 35 Patienten mit Zoster nachgewiesen werden. Da nur sieben Stämme von Patienten mit Primärinfektionen untersucht wurden, ist ein Vergleich mit den eigenen Daten nicht sinnvoll.

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit Varizellen sind VZV-Stämme vom Genotyp C und vom Genotyp A mit jeweils ca. 20% ungefähr gleich häufig und insgesamt seltener als solche vom Genotyp B. Bei den Zoster-Patienten sind Stämme mit dem Genotyp A derzeit nicht nachweisbar. Das lässt darauf schließen, dass Genotyp A-Stämme erst seit wenigen Jahren in Thüringen zirkulieren. Da VZV-Stämme des Genotyps A typischerweise in afrikanischen und asiatischen Regionen vorkommen, ist zu vermuten, dass die Stämme eingeschleppt wurden. Im Vergleich zum Anteil der Genotyp A-Stämme unter Varizellen-Patienten von ca. 20% ist der Ausländeranteil gemäß den Informationen des Ausländerbeauftragten in Thüringen mit 2% deutlich geringer (Peters 2005). Daher müssen andere Gründe für die vergleichsweise starke Verbreitung der Genotyp A-Stämme mitverantwortlich sein. Dies können zum Beispiel Auslandsaufenthalte im Rahmen von Urlauben bzw. der Arbeit von Botschaftern oder auch von militärischen Einsätzen deutscher Soldaten sein. Eine erhöhte Infektiösität dieser Stämme kann ebenfalls dafür verantwortlich sein, dass sich Genotyp A-Stämme in den vergangenen Jahren relativ stark in Thüringen ausbreiten konnten. Dafür ist allerdings in der Literatur bisher kein Anhalt zu finden. Eine Assoziation des Genotyps A mit der wärmeren Jahreszeit war in der vorliegenden Arbeit nicht nachzuweisen. Die 20 Genotyp A-Stämme wurden jeweils zu gleichen Teilen im Herbst und Winter bzw. im Sommer und Frühjahr bei den Patienten mit Varizellen nachgewiesen. Für die Zukunft muss in Deutschland mit dem Auftreten von Genotyp A-Stämmen bei Zoster-Erkrankungen gerechnet werden, was aus den klassischen Einwanderungsländern wie z.B. Grossbritannien bereits bekannt ist (Sengupta et al. 2007).

Die Stämme vom Genotyp A besitzen im Vergleich zu *Dumas* eine genetischen Homogenität von 99,56 bis 99,63% und sind damit am weitesten vom europäischen Referenzstamm *Dumas* entfernt. Die Unterschiede des Genotyps A betrafen alle gewählten Fragmente in den ORF 1, 21, 37 50, 54 und 60. Die Basenmutationen im Nt 33.646 im ORF 21 wurden bisher noch nicht beschrieben. Die übrigen Punktmutationen betreffen bereits bekannte Positionen in den Nt 648, 789, 790, 791 (ORF 1), 33.722, 33.725, 33.728 (ORF 21), 66.288 (ORF 37), 87.841

(ORF 50), 95.241, 95.300, 95.333 (ORF 54) und 101.464 (ORF 60) (Barrett-Muir et al. 2003, Philipps 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden vier Varianten des Genotyps A identifiziert, von denen einer, der Subgenotyp A1, bereits von Philipps (2007) klassifiziert wurde. Dem Subgenotyp A1 wurden 13 VZV-Stämme zugeordnet (Philipps 2007). Das genetische Profil der vier VZV-Stämme mit dem erstmals nachgewiesenen Subgenotyp A3 (413/00, 463/00, 1566/06, 1730/06) unterscheidet sich durch ein SNP von A1. Das Nt 95.333 ist im Gegensatz zu A1 eine Thyminbase, vergleichbar mit *Dumas*. Ein Abstammen der A1-Stämme von den A3-Stämmen mit einer zusätzlichen Punktmutation in der Position 95.333 kann daher als möglich erachtet werden (siehe Abb. 9 und 10, Seiten 50 und 51). Diese Frage kann jedoch nur durch Ganzgenomanalyse beantwortet werden. Gleiches gilt für die zwei VZV-Stämme 445/07 und 446/07 mit dem ebenfalls neu definierten Subgenotyp A5. Diese Variante unterscheidet sich von A3 nur durch ein SNP im Nt 33.646 (G>A). Das phylogenetische Verhältnis der Stämme zueinander könnte ebenfalls nur durch Ganzgenomanalyse bestimmt werden. Das genetische Profil des VZV-Stammes 60/06 beinhaltet ein SNP im Nt 66.288 (G>A), was für Genotyp B-Stämme typisch ist. In Anbetracht des ansonsten für Genotyp A typischen Profils, insbesondere der Substitutionen im ORF 54, erscheint eine Rekombination zwischen Genotyp A und B eher unwahrscheinlich. Daher wurde der Stamm als bisher nicht beschriebene Variante A4 klassifiziert.

- **VZV-Stämme mit nicht genau definiertem Genotyp**

Das VZV existiert seit ca. 400 Millionen Jahren (Grose 2006a). Das Virus entwickelte sich in Koevolution mit Primaten, Menschenaffen und später den Menschen in Ostafrika (McGeoch und Cook 1994). Infolge der Immigration der Menschen aus Afrika vor 45.000 Jahren kam es zur Verbreitung des VZV nach Asien und Europa. Durch Selektion und Rekombination verschiedener Viren kann es zur Entstehung der heute existierenden Hauptgenotypen gekommen sein. Trotz der lange zurückliegenden Migrationsbewegungen des Menschen als einzigem Wirt ist das VZV mit einer in der vorliegenden Arbeit errechneten genetischen Homogenität von 99,56 bis 99,96% zu *Dumas* und einer Unterteilung in die Hauptgenotypen A, B, C und J bemerkenswert konstant geblieben. Die ermittelten Werte der genetischen Homogenität von 99,56 bis 99,96% ähneln denen anderer Arbeiten (Barrett-Muir et al. 2002, McGeoch und Cook 1994, Tyler et al. 2007). Aufgrund bisheriger Untersuchungen scheinen Punktmutationen die Ursache für die Mehrzahl der genetischen Unterschiede zwischen verschiedenen VZV-Stämmen innerhalb der Genotypen zu sein. Sie können zur Bildung einer

Reihe von Varianten führen, von denen einige in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben wurden. Daneben scheinen jedoch auch Rekombinationen verschiedener Genotypen bei der Entstehung von Viren mit neuen Genmustern eine Rolle zu spielen.

Die Möglichkeit der genetischen Rekombination von VZV-Stämmen sowohl in vivo als auch in vitro wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Dohner et al. 1988, Schmidt 2005, Shiraki et al. 1991). Voraussetzung für die Entstehung von Rekombinanten nach Varizellen ist die Infektion einer Person mit mindestens zwei Wildtyp-Stämmen oder einem Impf- und einem Wildtyp-Stamm (Taha et al. 2006). In Folge der Einführung der Varzellenschutzimpfung besteht die Möglichkeit einer latenten Infektionen mit dem Impfvirus. Derzeit ist jedoch noch unklar, unter welchen Bedingungen die Infektion stattfindet. Man ist der Meinung, dass der Befall der Neurone während einer latenten Infektion von der Haut ausgeht und nichtzellgebundenes Virus erfordert. Es besteht deshalb die Annahme, dass Impfviren nur dann latent werden, wenn es nach Impfung zum Auftreten von Effloreszenzen kommt (Sauerbrei und Wutzler 2007c). Im Einklang damit steht, dass Zoster-Erkrankungen durch Impftyp-Viren bisher sehr nur selten beschrieben wurden (Uebe et al. 2002, Sauerbrei et al. 2004b, Liang et al. 2000) und nachgewiesene *vOka*-Stämme bei Varizellen Einzelfälle sind (Brunell und Argaw 2000, Brunell et al. 1987, Jean-Philippe et al. 2007). Kommt ein geimpftes Kind in Kontakt mit VZV-Wildtyp-Stämmen, besteht bei nicht ausreichender Immunität die prinzipielle Möglichkeit einer exogenen Reinfektion mit dem Wildtyp-Stamm. Bei nachfolgender Etablierung einer Latenz könnte daraus eine Rekombination der beiden Virusstämme resultieren. Das Ergebnis wäre z.B. eine mögliche B/J-Rekombinante, wie sie bereits von Philipps (2007) beschrieben wurde. Ein weiteres Szenario ist die Infektion mit zwei Wildtyp-Stämmen. Bei einem von Barrett-Muir et al. (2003) beschriebenen Fall handelte es sich um eine B/C-Rekombinante, die aus einer Infektion mit Stämmen der Genotypen B und C hervorgegangen sein kann. In Deutschland konnten bisher zwei mögliche Rekombinanten nachgewiesen werden, die jedoch der Bestätigung durch Ganzgenomanalyse bedürfen (Philipps 2007).

In der aktuellen Studie besitzt der Stamm 535/04 eines zweijährigen Jungen mit Varizellen Merkmale sowohl des Genotyps B als auch des Genotyps C. Der Leserahmen 21 präsentiert die für B-Stämme typische Konstellation mit Cytosin an den Positionen 33.722, 33.725 und 33.728. Im Gegensatz dazu entsprechen die ORF 37 und 50 komplett dem Genotyp C. Die ORF 54 und 60 lassen keine Unterscheidung zwischen den Genotypen B und C zu, da sie identische genetische Marker enthalten. Aufgrund dieser Befunde wurde der Stamm 535/04 als mögliche B/C-Rekombinante eingestuft. Allerdings konnte er nicht in die komplette

phylogenetische Analyse aufgenommen werden, da eine Sequenzierung des ORF 1 aufgrund mehrfacher negativer PCR-Ergebnisse nicht möglich war. Ein weiteres Isolat, Nummer 1820/06, eines dreijährigen Jungen mit Varizellen besitzt Merkmale der Genotypen A, B und C. ORF 1 und ORF 60 zeigen die Marker des Genotyps A. Die sequenzierten Abschnitte der ORF 21 und 50 sind identisch mit Genotyp A- und Genotyp B-Stämmen. ORF 37 vereint genetische Merkmale der Genotypen A sowie C, und ORF 54 besitzt die Marker von Genotyp B- und C-Stämmen. Die phylogenetische Analyse zeigt den Stamm 1820/06 zwischen den Genotypen A und B, was auf eine Rekombination hinweist. Der Beweis oder der Ausschluß einer Rekombination kann bei beiden Stämmen nur mit Ganzgenomanalyse erbracht werden.

5.4 Analyse der Genotypen des Varicella-Zoster-Virus in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf

Ausgehend vom aktuellen Stand der Forschung ist noch unklar, ob bestimmte Genotypen des VZV mit schweren bzw. atypischen Verläufen assoziiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden innerhalb der Varizellen-Gruppe fünf von der Regel abweichende Krankheitsverläufe beobachtet (siehe Tab. 21, Seite 53). Die Varizellen des verstorbenen 16jährigen Patienten (134/82) wurden durch einen Stamm des Genotyps C verursacht. Das gilt auch für den dreijährigen Patienten (1179/06), der Varizellen nach Impfung entwickelt hatte. Bei ihm konnte kein Hinweis auf eine Virusrekombination gefunden werden. Ein atypischer Verlauf der Varizellen (19/06) bei einem neunjährigen Mädchen und eine Superinfektion der Varizellenbläschen (408/05) waren mit VZV-Stämmen des Genotyps B assoziiert. Im Fall eines einjährigen Patienten mit einem schweren Verlauf der Varizellen (1566/06) wurde der Erreger als Genotyp A-Stamm klassifiziert. Die potentiell rekombinanten VZV-Stämme (535/04, 1820/06) hatten jeweils einen regelhaften Verlauf der Erkrankung verursacht.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist ein Zusammenhang schwerer oder atypischer Krankheitsverläufe mit bestimmten Genotypen oder Varianten des VZV im Rahmen dieser Arbeit nicht ersichtlich. Allerdings war die Fallzahl nicht regelhafter Verläufe von Varizellen mit fünf relativ gering. Es fiel auf, dass die von den Hauptgenotypen abweichenden Varianten des VZV nur einen der besonderen Verläufe (1566/06) hervorgerufen hatten (siehe Tab. 21, Seite 53). Darüber hinaus waren die potentiellen Rekombinanten 535/04 und 1820/06 für normale Varizellen verantwortlich. Damit ergaben die untersuchten Marker in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise für eine unterschiedliche Virulenz bestimmter VZV-

Genotypen. Möglicherweise ergibt die Untersuchung anderer genetischer Regionen, wie z.B. des ORF 68, einen Anhalt für eine erhöhte Virulenz bestimmter Genotypen. Wie bereits beschrieben, liegen Hinweise für eine Veränderung des VZV-Phänotyps nach Mutationen im ORF 68 vor (Tyler et al. 2007, Grose 2006b).

5.5 Genotypen des Varicella-Zoster-Virus in Deutschland im internationalen Vergleich

Mehrere internationale Arbeitsgruppen beschäftigten sich in der jüngsten Vergangenheit mit der geographischen Verteilung und Charakterisierung von VZV-Genotypen in Irland, den USA und Kanada, Großbritannien, Argentinien, Finnland, Indien sowie Australien und Neuseeland (Carr et al. 2004, Peters et al. 2006, Quinlivan et al. 2002, Sengupta et al. 2007, Dayan et al. 2004, Koskiniemi et al. 2007, Kaushik et al. 2008, Loparev et al. 2007a). Die Ergebnisse ausgewählter Studien im Vergleich zu den in Deutschland erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit sind in den Tab. 25, 26 und 27 aufgelistet.

- Genotypisierung des Varicella-Zoster-Virus von Patienten mit Varizellen im internationalen Vergleich

Von Sauerbrei et al. (2008) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 153 VZV-Stämme von Varizellen-Patienten untersucht (Tab. 25). Die VZV-Stämme des Genotyps B erwiesen sich mit einem Anteil von ca. 50% als häufigste Erreger von Varizellen, gefolgt von Genotyp A- und Genotyp C-Stämmen mit jeweils 24%. Mögliche Rekombinanten waren mit 2% selten (Sauerbrei et al. 2008). Die 13 VZV-Stämme aus Argentinien von Varizellen-Patienten zeigten alle die RFLPs der europäischen Genotypen B bzw. C (*PstI*⁺, *BglI*, *SmaI*), wurden allerdings nicht weiter differenziert (Dayan et al. 2004). In Indien erwiesen sich alle 92 analysierten VZV-Stämme von Varizellen als *PstI*⁺ und *BglI*⁺, was prinzipiell für den Genotyp A spricht (Kaushik et al. 2008). Entsprechend dieser Studie wurde kein Anhalt für das Zirkulieren europäischer Stämme in Indien gefunden. In den USA wurden durch Peters et al. (2006) fünf Varizellen-Stämme mittels Ganzgenomcharakterisierung charakterisiert, die sich alle als Genotyp C erwiesen. Gründe für das ausschließliche Vorkommen von VZV-Stämmen des Genotyps C und/oder des Genotyps B sind in der

geringeren Anzahl an Proben in den Studien von Dayan et al. (2004) und Peters et al. (2006) zu suchen. Frühere Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch Genotyp A- und Genotyp J-Stämme in den USA VZV-Primärinfektionen verursachen (LaRussa et al. 1992). Die Veröffentlichung von Kaushik et al. (2008) bestätigte die These von Barrett-Muir et al. (2003) über die unterschiedliche regionale Verteilung der VZV-Genotypen, da in Indien nur afrikanisch/asiatische Stämme nachgewiesen werden konnten.

Tab. 25: Genotypisierungsergebnisse im internationalen Vergleich bei Patienten mit Varizellen

Genotyp	Deutschland (Sauerbrei et al. 2008) & vorliegende Arbeit	Argentinien (Dayan et al. 2004)	Indien (Kaushik et al. 2008)	USA und Kanada (Peters et al. 2006)
C	37/153 (24%)	13/13 (100%)	0/92 (0%)	5/5 (100%)
B	76/153 (50%)		0/92 (0%)	0/5 (100%)
A	37/153 (24%)	0/13 (0%)	92/92 100%	0/5 (100%)
J	0/153 (0%)	0/13 (0%)	0/92 (0%)	0/5 (100%)
Mögliche Rekombinanten	3/153 (2%)	0/13 (0%)	0/92 (0%)	0/5 (100%)
Gesamtzahl der Patienten	153	13	92	5

- Genotypisierung des Varicella-Zoster-Virus von Patienten mit Zoster im internationalen Vergleich

Von Sauerbrei et al. (2008) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 54 VZV-Stämme von Zoster-Patienten untersucht (Tab. 26). Die VZV-Stämme des Genotyps C (54%) und die des Genotyps B (46%) waren bei Zoster-Patienten etwa gleich häufig. VZV-Stämme mit den Genotypen A und J konnten nicht identifiziert werden. In Ost-London wurden VZV-Stämme des Genotyps C mit 58% (Tab. 26) ebenfalls als häufigste Erreger des Zosters nachgewiesen. In dieser Studie wurden im Gegensatz zu den Ergebnissen in Deutschland nur 21% der Stämme als Genotyp B charakterisiert. Zusätzlich wiesen die Forscher 12% VZV-Stämme vom Genotyp A und 8% vom Genotyp J nach. Potentiell rekombinante Stämme wurden zu 1% nachgewiesen (Sengupta et al. 2007). Damit besteht in Ost-London im Vergleich zu den Ergebnissen in Deutschland eine deutlich heterogenere

Zusammensetzung der VZV-Genotypen bei Zoster, was auf die unterschiedliche Bevölkerungsstruktur mit zahlreichen Einwanderern aus dem Fernen Osten, dem indischen Subkontinent und Afrika sowie der Karibik zurückzuführen ist. Dies bezieht sich insbesondere auf den Nachweis von Genotyp A- und Genotyp J-Stämmen bei Zoster-Patienten sowie den Nachweis von zwei potentiell rekombinanten Stämmen. In Deutschland wurden bislang bei Zoster-Patienten bis auf einen Impftyp-Stamm, der zum Zoster geführt hatte, keine Genotyp A- oder Genotyp J-Stämme beschrieben (Sauerbrei et al. 2004b, Uebe et al. 2002). Entsprechend der Hypothese von der geographischen Häufung bestimmter Genotypen (Barrett-Muir et al. 2003) wurden in Indien auch bei Zoster-Patienten ausschließlich VZV-Stämme mit Restriktionsmustern des Genotyps A identifiziert (Kaushik et al. 2008). In den USA und Kanada wiesen Peters et al. (2006) mittels Ganzgenomcharakterisierung bei vier Zoster-Patienten einen Stamm vom Genotyp C, zwei Stämme vom Genotyp B und einen Stamm vom Genotyp J nach. Es muss angenommen werden, dass in amerikanischen Ballungszentren mit einer Vielzahl asiatischer und afrikanischer Bürger auch Genotyp A- oder Genotyp J-Stämme zum Zoster führen. Der Nachweis von 19-20% *BglI*⁺-Stämmen in den Vereinigten Staaten stützt diese Vermutung (LaRussa et al. 1992, Sauerbrei et al. 2003). Allerdings war eine epidemiologische Übersicht mittels Ganzgenomanalyse nicht Ziel der Studie von Peters et al. (2006).

Tab. 26 : Genotypisierungsergebnisse im internationalen Vergleich bei Patienten mit Zoster

Genotyp	Deutschland (Sauerbrei et al. 2008) & vorliegende Arbeit	Ost-London (Sengupta et al. 2007)	Indien (Kaushik et al. 2008)	USA und Kanada (Peters et al. 2006)
C	29/54 (54%)	173/298 (58%)	0/8 (0%)	1/4 (25%)
B	25/54 (46%)	62/298 (21%)	0/8 (0%)	2/4 (50%)
A	0/54 (0%)	36/298 (12%)	8/8 (100%)	0/4 (0%)
J	0/54 (0%)	25/298 (8%)	0/8 (0%)	1/4 (25%)
Mögliche Rekombinanten	0/54 (0%)	2/298 (1%)	0/8 (0%)	0/4 (0%)
Gesamtzahl der Patienten	54	298	8	4

- **Genotypisierung des Varicella-Zoster-Virus von Zoster- und Varizellen-Patienten im internationalen Vergleich**

Da zahlreiche Studien keine Unterscheidung der Patienten mit Varizellen oder Zoster durchführten, ist ein Vergleich auch mit der Gesamtzahl der einbezogenen Varizelleneinschließlich Zoster-Patienten sinnvoll. Im Rahmen der Arbeit von Sauerbrei et al. (2008) und der vorliegenden Studie wurden insgesamt 207 VZV-Stämme untersucht, von denen 153 von Varizellen und 54 von Zoster stammten (Tab. 27). Stämme des Genotyps B erwiesen sich mit insgesamt 49% als die häufigsten Erreger, gefolgt vom Genotyp C mit 32% und VZV-Stämmen des Genotyps A mit 17%. Potentiell rekombinante Stämme waren mit 2% sehr selten. VZV-Stämme des Genotyps J konnten nicht nachgewiesen werden. In Finnland wurden im Gegensatz zu Deutschland alle 28 untersuchten VZV-Stämme von Varizellen oder Zoster als Stämme des Genotyps C charakterisiert (Koskiniemi et al. 2007). Gründe können in einer sehr homogenen Bevölkerungsstruktur mit wenigen Immigranten zu suchen sein (Tab. 27). In Irland wurde im Vergleich dazu ein heterogenes Muster an Stämmen nachgewiesen. Unter 16 Stämmen von Varizellen oder Zoster ließen sich 37% als Genotyp C, 25% als Genotyp B, weitere 25% als Genotyp A und 13% als Genotyp J charakterisieren. Anhand dieser Ergebnisse erscheint es möglich, dass in Irland vermehrt VZV-Stämme durch Einwanderer eingeschleppt werden. Loparev et al. (2007a) untersuchten in Neuseeland 36 VZV-Stämme von Patienten mit Varizellen oder Zoster. Es erwiesen sich 66% der Erreger als Genotyp C-Stämme, 20% ließen sich als Genotyp B und 14% als Genotyp A charakterisieren. Auffällig ist in Neuseeland im Gegensatz zum Nachbarkontinent Australien das Fehlen von Stämmen des Genotyps J. Eine unterschiedliche Bevölkerungsstruktur mit einer geringeren Anzahl an japanischen Einwanderern kann ein Grund dafür sein. Die nordamerikanische Arbeitsgruppe um Loparev et al. (2007a) untersuchte in Australien 127 VZV-Stämme von Patienten mit Varizellen oder Zoster. Auch in Australien war die Gesamtprävalenz des Genotyps C mit 53% höher als in Deutschland (Tab. 27). Da aber im Ergebnisteil nicht zwischen Varizellen und Zoster getrennt wurde, kann ein direkter Vergleich nicht erfolgen. Stämme des Genotyps B traten mit 24% deutlich seltener als in Deutschland auf. Der Anteil ist mit jenem in Neuseeland von 20% vergleichbar. Genotyp A-Stämme wurden seltener als in Deutschland und Neuseeland nachgewiesen. Im Gegensatz zu Deutschland, Finnland und Neuseeland konnten aber 15% VZV-Stämme mit SNP des Genotyps J nachgewiesen werden.

Tab. 27: Genotypisierungsergebnisse im internationalen Vergleich bei Patienten mit Varizellen oder Zoster

Genotyp	Deutschland (Sauerbrei et al. 2008) & Vorliegende Arbeit	Finnland (Koskiniemi et al. 2007)	Irland (Carr et al. 2004)	Neuseeland (Loparev et al. 2007a)	Australien (Loparev et al. 2007a)
C	66/207 (32%)	28/28 (100%)	6/16 (37%)	24/36 (66%)	67/127 (53%)
B	101/207 (49%)	0/28 (0%)	4/16 (25%)	7/36 (20%)	30/127 (24%)
A	37/207 (17%)	0/28 (0%)	4/16 (25%)	5/36 (14%)	10/127 (8%)
J	0/207 (0%)	0/28 (0%)	2/16 (13%)	0/36 (0%)	20/127 (15%)
Mögliche Rekombinanten	3/207 (2%)	0/28 (0%)	0/16 (0%)	0/36 (0%)	0%
Gesamtzahl der Patienten	207	28	16	36	127

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in Europa VZV-Stämme der Genotypen B und C sowohl bei Varizellen als auch bei Zoster dominieren, wobei Deutschland das einzige Land ist, in dem bislang Genotyp B-Stämme häufiger als Genotyp C-Stämme nachgewiesen wurden. VZV-Stämme der Genotypen A und J kommen bisher bei Zoster-Patienten nur in Ballungszentren mit vielen Einwanderern wie in Ost-London vor (Sengupta et al. 2007). Obwohl Deutschland kein typisches Einwanderungsland ist, lassen sich bei Patienten mit Varizellen vermehrt Genotyp A-Stämme nachweisen. In den nächsten Jahrzehnten muss auch bei Zoster-Patienten mit dem Auftreten von VZV-Stämmen des Genotyps A gerechnet werden. Über die Genotypenverteilung von VZV-Stämmen in den USA und Kanada gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse, die aber auf eine ähnliche Situation wie in Europa hindeuten. Aus Südamerika liegen bis heute nur wenige Daten vor. Diese deuten jedoch auf eine Dominanz von Genotyp B und Genotyp C-Stämmen hin. Sowohl in Asien mit dem Kernland Indien als auch in Afrika dominiert der Genotyp A (Kaushik et al. 2008). In Japan scheinen mehrere Genotypen zu zirkulieren, wobei ca. 30% dem Genotyp J zugeordnet werden können (Hondo und Yogo 1989, Takada et al. 1995). Ähnlich wie in Europa dominieren in Australien Stämme der Genotypen B und C. Daneben sind aber in nennenswertem Umfang auch VZV-Stämme der Genotypen A und J vertreten, da Australien ein klassisches Einwanderungsland ist. Das Spektrum der VZV-Stämme in Neuseeland unterscheidet sich durch das Fehlen von Genotyp J-Stämmen von dem in Australien. Insgesamt belegen diese Daten die unterschiedliche geografische Verteilung der Genotypen des VZV

6 Schlußfolgerungen

1. Die Überwachung zirkulierender VZV-Stämme ist notwendig, um bei Varizellen oder Zoster nach Impfung Impftyp-Viren und potentielle Rekombinanten aus Wild- und Impftyp-Viren zu erfassen.
2. Die genetische Charakterisierung einer größeren Zahl an VZV-Stämmen von Patienten mit Varizellen und Zoster erlaubt darüber hinaus, Muster in der regionalen Verteilung der VZV-Wild-Genotypen zu erkennen.
3. Erste Verfahren zur Genotypisierung des VZV stützten sich auf die Analyse von RFLP in den ORF 38, 54 und 62, die mit geringem zeitlichen und materiellen Aufwand eine Unterscheidung der VZV-Genotypen in europäische, afrikanisch/asiatische Genotypen sowie japanische Wild- und Impftyp-Viren ermöglichen.
4. Aktuelle Verfahren zur Genotypisierung basieren auf dem Nachweis ausgewählter genotypspezifischer SNP mittels Sequenzierung. Damit kann das VZV in verschiedene Genotypen eingeteilt werden. Darüber hinaus ist auch die Identifikation von potentiellen Rekombinanten und Subgenotypen möglich.
5. Die bislang publizierten Methoden zur VZV-Genotypisierung unterscheiden sich in der Auswahl der ORF und auch in der Nomenklatur der Genotypen. Das aufwendigste Verfahren ist die Gesamtgenomanalyse.
6. Auf der Basis der Scattered-ORF-Methode wurden in der vorliegenden Arbeit DNA-Fragmente der ORF 1, 21, 37, 50, 54 und 60 sequenziert sowie der RFLP im ORF 62 analysiert.
7. In den eigenen Ergebnissen zeigten 54 von 96 VZV-Stämmen, die von Patienten mit Varizellen gewonnen worden waren, die Marker des Genotyps B, und jeweils 20 ließen sich als Genotypen C bzw. A charakterisieren. Zwei Stämme wurden als mögliche Rekombinanten eingeordnet, deren eindeutige Zuordnung nur mittels Ganzgenomanalyse möglich ist.
8. Die 34 VZV-Stämme von Zoster-Patienten wurden zu gleichen Teilen als Genotypen B und C charakterisiert.

9. Aufgrund der beschriebenen SNP wurden die Subgenotypen C4, C5, C6, C7 sowie B2, B3, B4, B5, B6 und A3, A4, A5 definiert.
10. VZV-Stämme des Genotyps A waren nur bei Patienten mit Varizellen nachweisbar. Genotyp C-Stämme waren bei Patienten mit Zoster signifikant häufiger als bei Patienten mit Varizellen zu finden. Der Genotyp B war in beiden Erkrankungsgruppen gleich häufig anzutreffen.
11. Aufgrund dieser Ergebnisse ist in der einbezogenen Thüringer Region eine Verschiebung zirkulierender VZV-Stämme zu Gunsten des Genotyps A nachweisbar. Unterschiede zu anderen europäischen Regionen bestehen auch in der Dominanz des Genotyps B.
12. Eine Korrelation zwischen Krankheitsverlauf von Varizellen bzw. Zoster und VZV-Genotyp war nicht nachweisbar.
13. Die genetische Homogenität aller analysierten VZV-Stämme betrug auf der Grundlage der einbezogenen DNA-Fragmente 99,63-99,96% im Vergleich zum Referenzstamm *Dumas*. Damit erweist sich das VZV genetisch als außerordentlich konstant. Für die Mehrzahl der gefundenen SNP scheinen Punktmutationen verantwortlich zu sein.
14. Die Scattered-ORF-Methode ist im Rahmen epidemiologischer Studien zur Genotypisierung kultivierter VZV-Stämme gut anzuwenden.
15. Bei nicht kultivierten VZV-Stämmen sollte aufgrund der begrenzten DNA-Menge die Sequenzierung auf die ORF 1, 21, 50 und 54 beschränkt bleiben.
16. Zur weiteren Verbesserung der eingesetzten Genotypisierungsmethode ist die Einbeziehung des ORF 22 zu empfehlen, um auch selten vorkommende, neu klassifizierte M-Genotypen zu erfassen.

7 Literaturverzeichnis

- Banz K, Wagenpfeil S, Neiss A, Goertz A, Staginnus U, Vollmar J, Wutzler P. 2003. The cost-effectiveness of routine childhood varicella vaccination in Germany. *Vaccine*, 21 (11-12):1256-1267.
- Barrett-Muir W, Hawrami K, Clarke J, Breuer J. 2001. Investigation of varicella-zoster virus variation by heteroduplex mobility assay. *Arch Virol Suppl*, 17 Suppl 1:17-25.
- Barrett-Muir W, Nichols R, Breuer J. 2002. Phylogenetic Analysis of Varicella-Zoster Virus: Evidence of Intercontinental Spread of Genotypes and Recombination. *J Virol*, 76:1971-1979.
- Barrett-Muir W, Scott FT, Aaby P, John J, Matondo P, Chaudhry QL, Siqueira M, Poulsen A, Yaminishi K, Breuer J. 2003. Genetic variation of varicella-zoster virus: evidence for geographical separation of strains. *J Med Virol*, 70 Suppl 1:S42-47.
- Baudoux L, Defechereux P, Schoonbroodt S, Merville MP, Rentier B, Piette J. 1995. Mutational analysis of varicella-zoster virus major immediate-early protein IE62. *Nucleic Acids Res*, 23 (8):1341-1349.
- Birch CJ, Druce JD, Catton MC, MacGregor L, Read T. 2003. Detection of varicella zoster virus in genital specimens using a multiplex polymerase chain reaction. *Sex Transm Infect*, 79 (4):298-300.
- Breuer J. 2007. Varicella Zoster Virus: Natural History and Current Therapies of Varicella and Herpes Zoster. *Herpes*, 14 Suppl 2:25-29
- Brunell PA, Argaw T. 2000. Chickenpox Attributable to a Vaccine Virus Contracted From a Vaccinee With Zoster. *Pediatrics*, 106 (2):28-29.
- Brunell PA, Geiser CF, Novelli V, Lipton S, Narkewicz S. 1987. Varicella-Like Illness Caused by Live Varicella Vaccine in Children With Acute Lymphocytic Leukemia. *Pediatrics*, 79:922-927.
- Carr MJ, McCormack GP, Crowley B. 2004. Genetic variation in clinical varicella-zoster virus isolates collected in Ireland between 2002 and 2003. *J Med Virol*, 73 (1):131-136.
- Cohen JI, Nguyen H. 1997. Varicella-zoster virus glycoprotein I is essential for growth of virus in Vero cells. *J Virol*, 71 (9):6913-6920.
- Cohen JI, Seidel KE. 1995. Varicella-zoster virus open reading frame 1 encodes a membrane protein that is dispensable for growth of VZV in vitro. *Virology*, 206 (2):835-842.
- Cohrs RJ, Barbour M, Gilden DH. 1998. Varicella-zoster virus gene 21: transcriptional start site and promoter region. *J Virol*, 72 (1):42-47.
- Cohrs RJ, Wischer J, Essman C, Gilden DH. 2002. Characterization of varicella-zoster virus gene 21 and 29 proteins in infected cells. *J Virol*, 76 (14):7228-7238.
- Davison AJ, Scott JE. 1986. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol*, 67 (Pt 9):1759-1816.
- Dayan GH, Panero MS, Debbag R, Urquiza A, Molina M, Prieto S, Perego MC, Scagliotti G, Galimberti D, Caroli G, Wolff C, Schmid DS, Loparev V, Guris D, Seward J. 2004. Varicella Seroprevalence and Molecular Epidemiology of Varicella-Zoster Virus in Argentina, 2002. *J Clin Microbiol*, 42: 5698-5704.

- de Ory F, Ramirez R, Garcia Comas L, Leon P, Sagues MJ, Sanz JC. 2004. Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? *Eur J Epidemiol*, 19 (1):85-89.
- de The G. 1997. Epstein-Barr virus and associated diseases. *Course of Medical Virology*, Institut Pasteur, 1995/1996. *Ann Med Interne (Paris)*, 148 (5):357-366.
- DGKJ. 2005. Stellungnahme zur Varizellenimpfung. Veröffentlichung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin e.V., Berlin.
<http://www.dgkj.de/604.html>.
- Dohner DE, Adams SG, Gelb LD. 1988. Recombination in tissue culture between varicella-zoster virus strains. *J Med Virol*, 24 (3):329-341.
- Dörries RG, Hof H, Geginat G. 2005. *Medizinische Mikrobiologie*. 2. Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Faga B, Maury W, Bruckner DA, Grose C. 2001. Identification and mapping of single nucleotide polymorphisms in the varicella-zoster virus genome. *Virology*, 280 (1):1-6.
- Forghani B, Ni L, Grose C. 1994. Neutralization epitope of the varicella-zoster virus gH:gL glycoprotein complex. *Virology*, 199 (2):458-462.
- Gershon AA. 2001. The current status of live attenuated varicella vaccine. *Arch Virol Suppl*, 17: 1-6.
- Gray WL. 2003. Pathogenesis of simian varicella virus. *J Med Virol*, 70 Suppl 1:S4-8.
- Grose C. 1994. Congenital infections caused by varicella zoster virus and herpes simplex virus. *Semin Pediatr Neurol*, 1 (1):43-49.
- Grose C. 2006a. Varicella zoster virus: out of Africa and into the research laboratory. *Herpes*, 13 (2):32-36.
- Grose C. 2006b. Varicella Pathogenesis: from Hox to Mutated gE glycoproteins. *Herpes*, 13 (3):59.
- Gross G. 1997. Zoster. The manifestation forms in the skin, complications and therapy. *Dtsch Med Wochenschr*, 122 (5):132-139.
- Gross G. 2006. Aktuelle Therapie des Herpes Zoster, 11. Internationales Wartburgkolloquium der Deutschen Gesellschaft zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. "Varizellen und Zoster" vom 18.09.-20.09.2006, Wartburg, Eisenach.
- Grote V, von Kries R, Springer W, Hammersen G, Kreth HW, Liese J. 2007. Varicella-related deaths in children and adolescents - Germany 2003-2004. *Acta Paediatr*. 2008 97(2):187-92.
- Gruhn B, Meerbach A, Hafer R, Zell R, Wutzler P, Zintl F. 2003. Pre-emptive therapy with rituximab for prevention of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 31 (11):1023-1025.
- Guess HA, Broughton DD, Melton LJ, 3rd, Kurland LT. 1985. Epidemiology of herpes zoster in children and adolescents: a population-based study. *Pediatrics*, 76 (4):512-517.
- Hammerschmidt T, Banz K, Wagenpfeil S, Neiss A, Wutzler P. 2004. Economic evaluation of varicella vaccination programmes: a review of the literature. *Pharmacoeconomics*, 22 (2):133-136; author reply 136-138.
- Hawrami K, Breuer J. 1997. Analysis of United Kingdom wild-type strains of varicella-zoster

- virus: differentiation from the Oka vaccine strain. *J Med Virol*, 53 (1):60-62.
- Heike HD, Târcolea C. 2000. Grundlagen der Statistik und Wahrscheinlichkeitsrechnung. 1. Auflage Oldenbourg Wissenschaftsverlag.
- Hill G, Chauvenet AR, Lovato J, McLean TW. 2005. Recent steroid therapy increases severity of varicella infections in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics*, 116 (4):e525-529.
- Hlinak GSP. 1974. Grundriss der Allgemeinen Virologie. 2. erweiterte Auflage Aufl. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.
- Hondo R, Yogo Y. 1989. Distribution of varicella-zoster virus strains carrying a PST1 site-less mutation in Japan and DNA change responsible for the mutation. *Jpn J Exp Med*, 59(6):233-237.
- Hood C, Cunningham AL, Slobedman B, Arvin AM, Sommer MH, Kinchington PR, Abendroth A. 2006. Varicella-zoster virus ORF63 inhibits apoptosis of primary human neurons. *J Virol*, 80 (2):1025-1031.
- Hufner K, Derfuss T, Herberger S, Sunami K, Russell S, Sinicina I, Arbusow V, Strupp M, Brandt T, Theil D. 2006. Latency of alpha-herpes viruses is accompanied by a chronic inflammation in human trigeminal ganglia but not in dorsal root ganglia. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (10):1022-1030.
- Jacquet A, Haumont M, Chellun D, Massaer M, Tufaro F, Bollen A, Jacobs P. 1998. The varicella zoster virus glycoprotein B (gB) plays a role in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Virus Res*, 53 (2):197-207.
- Jean-Philippe P, Freedman A, Chang MW, Steinberg SP, Gershon A, LaRussa PS, Borkowsky W. 2007. Severe Varicella Caused by Varicella-Vaccine Strain in a Child With Significant T-Cell Dysfunction. *Pediatrics*, 120:1345-1349.
- Jumaan Y, Jackson, Bohlke, Galil, Seward. 2005. Incidence of Herpes Zoster, Before and After Varicella-Vaccination–Associated Decreases in the Incidence of Varicella, 1992–2002. *J Infect Dis*, 191 (12):2002-2007.
- Kaushik KS, Lahiri KK, Chumber SK, Gupta GM, Kumar S, K. K, S. K. 2008. Molecular Characterization of Clinical Varicella-Zoster Strains from India and Differentiation from the Oka Vaccine Strain. *Jap J Infect Dis*, 61: 65-67.
- Kimberlin DW, Whitley RJ. 2007. Varicella-zoster vaccine for the prevention of herpes zoster. *N Engl J Med*, 356 (13):1338-1343.
- Köhler W, Fleischer B, Marre R. 2001. Medizinische Mikrobiologie. 8. Auflage, Urban und Fischer Verlag: Jena.
- Koskiniemi M, Lappalainen M, Schmid SD, Rubtcova E, Loparev V. 2007. Genotypic Analysis of Varicella-Zoster Virus and Its Seroprevalence in Finland. *Clin Vaccine Immunol*, 14 (9):1057–1061.
- Krause PR, Klinman DM. 2000. Varicella vaccination: evidence for frequent reactivation of the vaccine strain in healthy children. *Nat Med*, 6 (4):451-454.
- Ku CC, Padilla JA, Grose C, Butcher EC, Arvin AM. 2002. Tropism of varicella-zoster virus for human tonsillar CD4(+) T lymphocytes that express activation, memory, and skin homing markers. *J Virol*, 76 (22):11425-11433.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 5 (2):150-163.

- Kyratsous CA, Silverstein SJ. 2007. BAG3, a host cochaperone, facilitates varicella-zoster virus replication. *J Virol*, 81 (14):7491-7503.
- LaRussa P, Lungu O, Hardy I, Gershon A, Steinberg SP, Silverstein S. 1992. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products from vaccine and wild-type varicella-zoster virus isolates. *J Virol*, 66 (2):1016-1020.
- LaRussa P, Steinberg SP, Shapiro E, Vazquez M, Gershon AA. 2000. Viral strain identification in varicella vaccinees with disseminated rashes. *Pediatr Infect Dis J*, 19 (11):1037-1039.
- Liang MG, MD, Heidelberg KA, MD, Jacobson RM, MD, McEvoy MT. 2000. Herpes Zoster after varicella immunization. *J Am Acad Dermatol*, 38:761-763.
- Loparev VN, Argaw T, Krause PR, Takayama M, Schmid DS. 2000. Improved identification and differentiation of varicella-zoster virus (VZV) wild-type strains and an attenuated varicella vaccine strain using a VZV open reading frame 62-based PCR. *J Clin Microbiol*, 38 (9):3156-3160.
- Loparev VN, Gonzalez A, Deleon-Carnes M, Tipples G, Fickenscher H, Torfason EG, Schmid DS. 2004. Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J Virol*, 78 (15):8349-8358.
- Loparev VN, Martro E, Rubtcova E, Rodrigo C, Piette JC, Caumes E, Vernant JP, Schmid DS, Fillet AM. 2007b. Toward universal varicella-zoster virus (VZV) genotyping: diversity of VZV strains from France and Spain. *J Clin Microbiol*, 45 (2):559-563.
- Loparev VN, Rubtcova EN, Bostik V, Govil D, Birch CJ, Druce JD, Schmid DS, Croxson MC. 2007a. Identification of five major and two minor genotypes of varicella-zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand. *J Virol*, 81 (23):12758-12765.
- Mahalingam R, Lasher R, Wellish M, Cohrs RJ, Gilden DH. 1998. Localization of varicella-zoster virus gene 21 protein in virus-infected cells in culture. *J Virol*, 72 (8):6832-6837.
- McGeoch DJ, Cook S. 1994. Molecular phylogeny of the alphaherpesvirinae subfamily and a proposed evolutionary timescale. *J Mol Biol*, 238 (1):9-22.
- Melzi ML, Sonzogni A, Comoli P, Stroppa P, Riva S, Altobelli M, Casati A, Torre G, Alberti D, Guizzetti M, Furione M, Spada M, Colledan M, Gridelli B. 2006. Specific autologous cytotoxic T lymphocytes for chronic varicella in a liver transplanted child. *Pediatr Transplant*, 10 (2):240-243.
- Modrow F, Truyen. 2003. *Molekulare Virologie*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin.
- Moffat JF, Stein MD, Kaneshima H, Arvin AM. 1995. Tropism of varicella-zoster virus for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes and epidermal cells in SCID-hu mice. *J Virol*, 69 (9):5236-5242.
- Muir WB, Nichols R, Breuer J. 2002. Phylogenetic analysis of varicella-zoster virus: evidence of intercontinental spread of genotypes and recombination. *J Virol*, 76 (4):1971-1979.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263-273.
- Natoli S, Ciotti M, Paba P, Testore GP, Palmieri G, Orlandi A, Sabato AF, Leonardis F. 2006.

- A novel mutation of varicella-zoster virus associated to fatal hepatitis. *J Clin Virol*, 37 (1):72-74.
- Norberg P, Liljeqvist JA, Bergstrom T, Sammons S, Schmid DS, Loparev VN. 2006. Complete-genome phylogenetic approach to varicella-zoster virus evolution: genetic divergence and evidence for recombination. *J Virol*, 80 (19):9569-9576.
- Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, Schmader KE, Straus SE, Gelb LD, Arbeit RD, Simberkoff MS, Gershon AA, Davis LE, Weinberg A, Boardman KD, Williams HM, Zhang JH, Peduzzi PN, Beisel CE, Morrison VA, Guatelli JC, Brooks PA, Kauffman CA, Pachucki CT, Neuzil KM, Betts RF, Wright PF, Griffin MR, Brunell P, Soto NE, Marques AR, Keay SK, Goodman RP, Cotton DJ, Gnann JW, Jr., Loutit J, Holodniy M, Keitel WA, Crawford GE, Yeh SS, Lobo Z, Toney JF, Greenberg RN, Keller PM, Harbecke R, Hayward AR, Irwin MR, Kyriakides TC, Chan CY, Chan IS, Wang WW, Annunziato PW, Silber JL. 2005. A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med*, 352 (22):2271-2284.
- Pastuszak AL, Levy M, Schick B, Zuber C, Feldkamp M, Gladstone J, Bar-Levy F, Jackson E, Donnenfeld A, Meschino W, et al. 1994. Outcome after maternal varicella infection in the first 20 weeks of pregnancy. *N Engl J Med*, 330 (13):901-905.
- Peters E. Ausländerreport 2005. Veröffentlichung des Ausländerbeauftragten der Thüringer Landesregierung Eckehard Peters.
<http://www.thueringen.de/imperia/md/content/tsk/ab/auslaender2005.pdf>,
<http://www.thueringen.de/de/ab/info/alth/content.html>.
- Peters GA, Tyler SD, Grose C, Severini A, Gray MJ, Upton C, Tipples GA. 2006. A full-genome phylogenetic analysis of varicella-zoster virus reveals a novel origin of replication-based genotyping scheme and evidence of recombination between major circulating clades. *J Virol*, 80 (19):9850-9860.
- Petursson G, Helgason S, Gudmundsson S, Sigurdsson JA. 1998. Herpes zoster in children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J*, 17 (10):905-908.
- Philipps A. 2007. Molekulare Typisierung von VZV-Stämmen in Deutschland [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich Schiller Universität.
- Piette J, Defechereux P, Baudoux L, Debrus S, Merville MP, Rentier B. 1995. Varicella-zoster virus gene regulation. *Neurology*, 45 (12 Suppl 8):S23-27.
- Puchhammer-Stöckl E, Popow-Kraupp T, Heinz FX, Mandl CW, Kunz C. 1991. Detection of varicella-zoster virus DNA by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of patients suffering from neurological complications associated with chicken pox or herpes zoster. *J Clin Microbiol*, 29 (7):1513-1516.
- Quinlivan M, Breuer J. 2006. Molecular studies of Varicella zoster virus. *Rev Med Virol*, 16 (4):225-250.
- Quinlivan M, Gershon AA, Steinberg SP, Breuer J. 2005. An evaluation of single nucleotide polymorphisms used to differentiate vaccine and wild type strains of varicella-zoster virus. *J Med Virol*, 75 (1):174-180.
- Quinlivan M, Hawrami K, Barrett-Muir W, Aaby P, Arvin A, Chow VT, John TJ, Matondo P, Peiris M, Poulsen A, Siqueira M, Takahashi M, Talukder Y, Yamanishi K, Leedham-Green M, Scott FT, Thomas SL, Breuer J. 2002. The molecular epidemiology of varicella-zoster virus: evidence for geographic segregation. *J Infect Dis*, 186 (7):888-894.
- Rodriguez JE, Moninger T, Grose C. 1993. Entry and egress of varicella virus blocked by

- same anti-gH monoclonal antibody. *Virology*, 196 (2):840-844.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12):5463-5467.
- Sauerbrei A. 1998. Varicella-zoster virus infections in pregnancy. *Intervirology*, 41 (4-5):191-196.
- Sauerbrei A. 2006. Kostenersparnis in Millionenhöhe durch flächendeckende Varizellenimpfung. *Pädiatrie hautnah*, S2: 13-15.
- Sauerbrei A, Eichhorn U, Gawellek S, Egerer R, Schacke M, Wutzler P. 2003. Molecular characterisation of varicella-zoster virus strains in Germany and differentiation from the Oka vaccine strain. *J Med Virol*, 71 (2):313-319.
- Sauerbrei A, Eichhorn U, Schacke M, Wutzler P. 1999. Laboratory diagnosis of herpes zoster. *J Clin Virol*, 14 (1):31-36.
- Sauerbrei A, Färber I, Brandstädt A, Schacke M, Wutzler P. 2004a. Immunofluorescence test for sensitive detection of varicella-zoster virus-specific IgG: an alternative to fluorescent antibody to membrane antigen test. *J Virol Methods*, 119 (1):25-30.
- Sauerbrei A, Philipps A, Zell R, Wutzler P. 2007. Genotyping of varicella-zoster virus strains after serial passages in cell culture. *J Virol Methods*, 145 (1):80-83.
- Sauerbrei A, Rubtcova E, Wutzler P, Schmid DS, Loparev VN. 2004b. Genetic profile of an Oka varicella vaccine virus variant isolated from an infant with zoster. *J Clin Microbiol*, 42 (12):5604-5608.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2006. Serological Detection of Varicella-Zoster Virus-specific immunoglobulin g by an enzyme-linked immunosorbent assay using glycoprotein antigen. *J Clin Microbiol*, 44: 3094-3097.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2007a. Different genotype pattern of Varicella-Zoster virus obtained from patients with varicella and zoster in Germany. *J Med Virol*, 79:1025-1031.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2007b. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy: current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 2: Varicella-zoster virus infections. *Med Microbiol Immunol*, 196 (2):95-102.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2007c. *Varicella-Zoster-Virus-Infektionen: Akutelle Prophylaxe und Therapie*. 2. Auflage. Bremen, London, Boston: Uni-Med.
- Sauerbrei A, Zell R, Harder M, Wutzler P. 2006. Genotyping of different varicella vaccine strains. *J Clin Virol*, 37 (2):109-117.
- Sauerbrei A, Zell R, Philipps A, Wutzler P. 2008. Genotypes of varicella-zoster virus wild-type strains in Germany. *J Med Virol*, 80 (6):1123-1130.
- Schmidt M. 2005. *Rekombinante Varianten eines Wildtyp-Isolats des Varicella-Zoster-Virus* [Dissertation]. Nürnberg: Friedrich-Alexander-Universität.
- Schmidt-Chanasit J, Stürmer M, Hahn A, Schad SG, Gross G, Ulrich RG, Heckel G, Doerr HW. 2007. Novel Approach for Genotyping Varicella-Zoster Virus Strains from Germany. *J Clin Microbiol*, 45 (11):3540-3545.
- Sears LE, Moran LS, Kissinger C, Creasey T, Perry-O'Keefe H, Roskey M, Sutherland E, Slatko BE. 1992. CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques*, 13 (4):626-633.

- Sengupta N, Y. T, Scott FT, Leedham-Green ME, Quinlivan M, Breuer J. 2007. Varicella-Zoster-Virus Genotypes in East London: A Prospective Study in Patients with Herpes Zoster. *J Infect Dis*, 196 (7):1014–1020.
- Shiraki K, Hayakawa Y, Mori H, Namazue J, Takamizawa A, Yoshida I, Yamanishi K, Takahashi M. 1991. Development of immunogenic recombinant Oka varicella vaccine expressing hepatitis B virus surface antigen. *J Gen Virol*, 72 (Pt 6):1393-1399.
- Sitzmann FC. 2007. Pädiatrie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Slatko BE. 1996. Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol*, 58:413-423.
- STIKO. 2004. RKI : Begründung der Ständigen Impfkommision für eine allgemeine Varizellenimpfung. *Epid Bull* 49:421-44.
- STIKO. 2007. RKI : Empfehlungen der Ständigen Impfkommision Berlin. *Epid Bull* 31:287-292
- Straus SE, Reinhold W, Smith HA, Ruyechan WT, Henderson DK, Blaese RM, Hay J. 1984. Endonuclease analysis of viral DNA from varicella and subsequent zoster infections in the same patient. *N Engl J Med*, 311 (21):1362-1364.
- Taha Y, Scott FT, Parker P, Syndercombe Court D, Quinlivan M, Breuer J. 2006. Reactivation of 2 Genetically Distinct Varicella-Zoster Viruses in the Same Individual. *Clin Infect Dis*, 43 (10):1301-1303.
- Takada M, Suzutani T, Yoshida I, Matoba M, Azuma M. 1995. Identification of varicella-zoster virus strains by PCR analysis of three repeat elements and a PstI-site-less region. *J Clin Microbiol*, 33 (3):658-660.
- Takahashi M. 2001. 25 years' experience with the Biken Oka strain varicella vaccine: a clinical overview. *Paediatr Drugs*, 3 (4):285-292.
- Takahashi M, Asano Y, Kamiya H, Baba K. 1985. Development of live varicella vaccine. *Nippon Rinsho*, 43 (7):1535-1541.
- Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, Asano Y, Yazaki T. 1974. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet*, 2 (7892):1288-1290.
- Takayama M, Takayama N, Inoue N, Kameoka Y. 1996. Application of long PCR method of identification of variations in nucleotide sequences among varicella-zoster virus isolates. *J Clin Microbiol*, 34 (12):2869-2874.
- Takayama N, Yamada H, Kaku H, Minamitani M. 2000. Herpes zoster in immunocompetent and immunocompromised Japanese children. *Pediatr Int*, 42 (3):275-279.
- Tipples GA, Stephens GM, Sherlock C, Bowler M, Hoy B, Cook D, Grose C. 2002. New variant of varicella-zoster virus. *Emerg Infect Dis*, 8 (12):1504-1505.
- Tsolia M, Gershon AA, Steinberg SP, Gelb L. 1990. Live attenuated varicella vaccine: evidence that the virus is attenuated and the importance of skin lesions in transmission of varicella-zoster virus. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Varicella Vaccine Collaborative Study Group. *J Pediatr*, 116 (2):184-189.
- Tyler SD, Peters GA, Grose C, Severini A, Gray MJ, Upton C, Tipples GA. 2007. Genomic cartography of varicella-zoster virus: a complete genome-based analysis of strain variability with implications for attenuation and phenotypic differences. *Virology*, 359 (2):447-458.
- Uebe B, Sauerbrei A, Burdach S, Horneff G. 2002. Herpes zoster by reactivated vaccine varicella zoster virus in a healthy child. *Eur J Pediatr*, 161 (8):442-444.

- Vollandt R. 2005. Medizinische Biometrie für Humanmediziner - Skript. Jena: Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Wagenaar TR, Chow VT, Buranathai C, Thawatsupha P, Grose C. 2003. The out of Africa model of varicella-zoster virus evolution: single nucleotide polymorphisms and private alleles distinguish Asian clades from European/North American clades. *Vaccine*, 21 (11-12):1072-1081.
- Wagenpfeil S, Neiss A, Banz K, Wutzler P. 2004. Empirical data on the varicella situation in Germany for vaccination decisions. *Clin Microbiol Infect*, 10 (5):425-430.
- Wassilew. 2006. Brivudin in der Therapie des Zosters - Aussagen der wissenschaftlichen Studien. 11. Internationales Wartburgkolloquium der Deutschen Gesellschaft zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. "Varizellen und Zoster" vom 18.09.-20.09.2006, Wartburg, Eisenach.
- Weller TH, Witton HM, Bell EJ. 1958. The etiologic agents of varicella and herpes zoster; isolation, propagation and cultural characteristics in vitro. *J Exp Med*, 108:843-868.
- Whitley RJ, Weiss HL, Soong SJ, Gnann JW. 1999. Herpes zoster: risk categories for persistent pain. *J Infect Dis*, 179 (1):9-15.
- Wiersbitzky S, Beyersdorf E, Burtzlaff C, Wiersbitzky H, Crusius S, Weinke I. 1993. Pre- and perinatal infections due to human herpesvirus-6 and Epstein-Barr-virus with lethal outcome or severe residual encephalopathy. *Pediatr Grenzgeb*, 31 (4):199-201.
- Wutzler P. 2000. Positionspapier zur Varizellenimpfung. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 43:293-295.
- Wutzler P, Färber I, Eichhorn U, Helbig B, Sauerbrei A, Brandstädt A, Rabenau HF. 2000. Seroprevalence of herpes simplex type 1 and type 2 in selected populations-relevance for the incidence of genital herpes. *J Med Virol*, 61 (2):201-207.
- Wutzler P, Färber I, Wagenpfeil S, Bisanz H, Tischer A. 2001. Seroprevalence of varicella-zoster virus in the German population. *Vaccine*, 20 (1-2):121-124.
- Wutzler P, Neiss A, Banz K, Goertz A, Bisanz H. 2002. Can varicella be eliminated by vaccination? Potential clinical and economic effects of universal childhood varicella immunisation in Germany. *Med Microbiol Immunol*, 191 (2):89-96.
- Wutzler P, Sauerbrei A. 2007. Varicella during pregnancy and in neonates. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 50 (2):237-244.
- Xia D, Straus SE. 1999. Transcript mapping and transregulatory behavior of varicella-zoster virus gene 21, a latency-associated gene. *Virology*, 258 (2):304-313.
- Yamagishi Y, Sadaoka T, Yoshii H, Somboonthum P, Imazawa T, Nagaike K, Ozono K, Yamanishi K, Mori Y. 2008. Varicella-Zoster Virus Glycoprotein M Homolog is Glycosylated, Expressed on the Viral Envelope, and Functions in Viral Cell-to-Cell Spread. *J Virol*, 82 (2):795-804.
- Zerboni L, Ku CC, Jones CD, Zehnder JL, Arvin AM. 2005. Varicella-zoster virus infection of human dorsal root ganglia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (18):6490-6495.
- Zhu Z, Gershon MD, Ambron R, Gabel C, Gershon AA. 1995. Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (8):3546-3550.

Ziebold C, von Kries R, Lang R, Weigl J, Schmitt HJ. 2001. Severe complications of varicella in previously healthy children in Germany: a 1-year survey. *Pediatrics*, 108 (5):E79.

8 Anhang

8.1 Tabellarischer Anhang

Tab. 28: Daten der einbezogenen Patienten mit Varizellen

Lfd. Nr.	Labornummer	Alter [Jahren]	Geschlecht	Immun-defizienz	Eingesandtes Untersuchungsmaterial	Verlauf
1	134 / 82	16	m	ja	Bläscheninhalt	letal
2	78 / 84	n.b.	n.b.	nein	Bläscheninhalt	normal
3	623 / 98	17	m	nein	Liquor	normal
4	413 / 00	2	m	ja	Bläscheninhalt	normal
5	463 / 00	5 Monate	m	nein	Bläscheninhalt	normal
6	842 / 00	12	m	nein	Bläscheninhalt	normal
7	666 / 03	20	m	n.b.	Bläscheninhalt	normal
8	750 / 03	32	w	n.b.	Bläscheninhalt	normal
9	918 / 03	7	m	n.b.	Bläscheninhalt	normal
10	1306 / 03	61	m	n.b.	Abstrich	normal
11	348 / 04	4	m	nein	Bläscheninhalt	normal
12	476 / 04	26	w	n.b.	Bläscheninhalt	normal
13	535 / 04	2	m	nein	Bläscheninhalt	normal
14	542 / 04	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
15	659 / 04	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
16	660 / 04	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
17	661 / 04	7	m	nein	Bläscheninhalt	normal
18	691 / 04	2	w	nein	Bläscheninhalt	normal
19	711 / 04	2	m	nein	Bläscheninhalt	normal
20	717 / 04	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
21	906 / 04	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
22	907 / 04	4	m	nein	Bläscheninhalt	normal
23	956 / 04	4	m	nein	Bläscheninhalt	normal
24	957 / 04	5	m	nein	Bläscheninhalt	normal
25	1029 / 04	4	m	nein	Bläscheninhalt	normal
26	1045 / 04	1	w	nein	Bläscheninhalt	normal
27	1058 / 04	3	w	nein	Bläscheninhalt	normal
28	1069 / 04	5	m	nein	Bläscheninhalt	normal
29	1137 / 04	5	m	nein	Bläscheninhalt	normal
30	1138 / 04	5	m	nein	Bläscheninhalt	normal
31	1146 / 04	4	m	nein	Bläscheninhalt	normal

Fortsetzung Tab. 28

Lfd. Nr.	Labornummer	Alter [Jahren]	Geschlecht	Immun-defizienz	Eingesandtes Untersuchungsmaterial	Verlauf
32	1147 / 04	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
33	1148 / 04	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
34	1167 / 04	6	m	nein	Bläscheninhalt	normal
35	1170 / 04	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
36	1177 / 04	3	w	nein	Bläscheninhalt	normal
37	1194 / 04	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
38	1213 / 04	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
39	1219 / 04	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
40	1346 / 04	2	m	nein	Bläscheninhalt	normal
41	2038 / 04	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
42	2099 / 04	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
43	408 / 05	2	w	nein	Bläscheninhalt	Superinfektion
44	549 / 05	3	w	nein	Bläscheninhalt	normal
45	550 / 05	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
46	647 / 05	2	w	nein	Bläscheninhalt	normal
47	706 / 05	5	m	nein	Bläscheninhalt	normal
48	707 / 05	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
49	768 / 05	3	w	nein	Bläscheninhalt	normal
50	954 / 05	2	m	nein	Bläscheninhalt	normal
51	955 / 05	6	w	nein	Bläscheninhalt	normal
52	1002 / 05	1	m	nein	Bläscheninhalt	normal
53	1152 / 05	32	w	nein	Bläscheninhalt	normal
54	16 / 06	3	w	nein	Bläscheninhalt	normal
55	17 / 06	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
56	18 / 06	3	w	nein	Bläscheninhalt	normal
57	19 / 06	9	w	nein	Bläscheninhalt	atypisch
58	60 / 06	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
59	89 / 06	1	w	nein	Bläscheninhalt	normal
60	259 / 06	5	w	nein	Bläscheninhalt	normal
61	278 / 06	8	w	nein	Bläscheninhalt	normal
62	386 / 06	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
63	507 / 06	6	m	nein	Bläscheninhalt	normal
64	508 / 06	2	w	nein	Bläscheninhalt	normal
65	509 / 06	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
66	599 / 06	5	w	nein	Bläscheninhalt	normal
67	710 / 06	3	w	nein	Bläscheninhalt	normal
68	978 / 06	6	m	nein	Bläscheninhalt	normal
69	1057 / 06	2	m	nein	Bläscheninhalt	normal

Fortsetzung Tab. 28

Lfd. Nr.	Labornummer	Alter [Jahren]	Geschlecht	Immun-defizienz	Eingesandtes Untersuchungsmaterial	Verlauf
70	1058 / 06	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
71	1075 / 06	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
72	1177 / 06	1	w	nein	Bläscheninhalt	normal
73	1179 / 06	3	m	nein	Bläscheninhalt	nach Impfung
74	1264 / 06	1	w	nein	Bläscheninhalt	normal
75	1265 / 06	1	m	nein	Bläscheninhalt	normal
76	1266 / 06	2	m	nein	Bläscheninhalt	normal
77	1406 / 06	6	w	nein	Bläscheninhalt	normal
78	1407 / 06	2	m	nein	Bläscheninhalt	normal
79	1433 / 06	1	m	nein	Bläscheninhalt	normal
80	1565 / 06	1	w	nein	Bläscheninhalt	normal
81	1566 / 06	1	m	nein	Bläscheninhalt	schwer
82	1730 / 06	6	m	nein	Bläscheninhalt	normal
83	1819 / 06	5	m	nein	Bläscheninhalt	normal
84	1820 / 06	3	m	nein	Bläscheninhalt	normal
85	2253 / 06	10	m	nein	Bläscheninhalt	normal
86	2254 / 06	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
87	2255 / 06	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
88	2256 / 06	4	m	nein	Bläscheninhalt	normal
89	2277 / 06	23	w	nein	Bläscheninhalt	normal
90	2394 / 06	19	m	nein	Bläscheninhalt	normal
91	151 / 07	4	w	nein	Bläscheninhalt	normal
92	298 / 07	2	m	nein	Bläscheninhalt	normal
93	405 / 07	26	m	nein	Bläscheninhalt	normal
94	445 / 07	4	m	nein	Bläscheninhalt	normal
95	446 / 07	1	m	nein	Bläscheninhalt	normal
96	500 / 07	1	w	nein	Bläscheninhalt	normal

n.b.: nicht bekannt

m: männlich

w: weiblich

Tab. 29: Daten der einbezogenen Patienten mit Zoster bei jeweils regelhaftem Verlauf

Lfd. Nr.	Labornummer	Alter [Jahren]	Geschlecht	Immundefizienz	Eingesandtes Untersuchungsmaterial
1	243 / 00	31	m	nein	Bläscheninhalt
2	375 / 00	22	w	ja	Bläscheninhalt
3	665 / 00	39	m	nein	Bläscheninhalt
4	914 / 00	71	m	nein	Bläscheninhalt
5	596 / 02	57	m	ja	Bläscheninhalt (Isolat)
6	81 / 03	65	w	n.b.	Bläscheninhalt
7	126 / 03	49	w	n.b.	Bläscheninhalt
8	419 / 03	17	w	ja	Bläscheninhalt
9	578 / 03	25	w	nein	Bläscheninhalt
10	710 / 03	92	m	nein	Bläscheninhalt
11	859 / 03	25	m	nein	Abstrich
12	921 / 03	71	w	n.b.	Bläscheninhalt
13	1122 / 03	76	w	nein	Bläscheninhalt
14	1234 / 03	71	w	nein	Bläscheninhalt
15	1466 / 03	68	m	n.b.	Bläscheninhalt
16	1715 / 03	75	w	n.b.	Bläscheninhalt
17	1801 / 03	63	m	n.b.	Bläscheninhalt
18	1881 / 03	15	w	n.b.	Bläscheninhalt
19	1952 / 03	60	m	n.b.	Bläscheninhalt
20	2488 / 03	57	m	n.b.	Bläscheninhalt
21	2521 / 03	22	m	ja	Bläscheninhalt
22	2526 / 03	91	w	nein	Bläscheninhalt
23	2560 / 03	28	m	nein	Bläscheninhalt
24	0012/04	51	w	nein	Bläscheninhalt
25	517 / 04	53	m	n.b.	Bläscheninhalt
26	577 / 04	68	w	n.b.	Bläscheninhalt
27	647 / 04	41	w	n.b.	Bläscheninhalt
28	1308 / 04	82	w	nein	Bläscheninhalt
29	1379 / 04	93	m	nein	Bläscheninhalt
30	1571/06	18	w	ja	Bläscheninhalt
31	52/07	18	m	ja	Bläscheninhalt
32	391/07	15	m	ja	Bläscheninhalt
33	431 / 07	13	m	ja	Bläscheninhalt
34	688 / 07	85	m	n.b.	Hautgewebe

n.b.: nicht bekannt

m: männlich

w: weiblich

Tab. 30: Übersicht über die genetischen Polymorphismen der einbezogenen VZV-Stämme von Patienten mit Varizellen

Nukleotide, die dem Referenzstamm *Dumas* entsprechen, sind **grün** unterlegt. Nukleotide, die bei *pOka* zu finden sind, werden **blau** dargestellt. **Rot** sind solche Substitutionen unterlegt, die weder in den DNA-Sequenzen von *pOka* noch in denen von *Dumas* zu finden sind. **Heller** Untergrund bedeutet, dass die Nukleotide mit beiden Referenzstämmen übereinstimmen. **Grau** markierte Bereiche konnten nicht sequenziert und **schwarz** markierte Bereiche nicht amplifiziert werden.

		ORF	1						21							37	50	54							60	62	Virus- anzucht in HELF		
Lfd. Nr.	Labor- nummer	Position / Genotyp	626	685	762	789	790	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319	95333	95339		101464	Wild- / Impftyp
Referenzstämme																													
Dumas		C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	T	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C		
pOka		J	A	A	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	C	T	T	C	C		
Komplett charakterisierte Patientenstämme Varizellen																													
1	134/82	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (10. Passage)
2	78/84	B1	A	G	A	T	T	T	G	G	G	C	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	G	T	C	C	Wildtyp	+ (10. Passage)
3	623/98	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (3. Passage)
4	413/00	A3	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	T	C	A	Wildtyp	+ (4. Passage)
5	463/00	A3	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	T	C	A	Wildtyp	+ (4. Passage)
6	842/00	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (9. Passage)
7	666/03	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
8	750/03	C4	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	T	C	T	T	T	C	Wildtyp	Ø
9	918/03	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø

Fortsetzung Tab. 30

		ORF	1						21						37	50	54						60	62	Virus- anzucht in HELF				
Lfd. Nr.	Labor- nummer	Position / Genotyp	626	685	762	789	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319	95333		95339	101464	Wild- / Impftyp	
10	1306/03	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
11	348/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
12	476/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
13	659/04	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	Wildtyp	Ø
14	660/04	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
15	661/04	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
16	691/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
17	711/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
18	717/04	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
19	906/04	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
20	907/04	C4	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	T	C	T	T	T	C	Wildtyp	Ø
21	956/04	C5	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	G	G	C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
22	957/04	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
23	1029/04	C7	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	C	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
24	1045/04	C5	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	G	G	C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
25	1058/04	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	Wildtyp	Ø
26	1069/04	C5	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	G	G	C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
27	1137/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
28	1138/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
29	1146/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
30	1147/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø

Fortsetzung Tab. 30

		ORF	1						21							37	50	54							60	62	Virus- anzucht in HELF		
Lfd. Nr.	Labor- nummer	Position / Genotyp	626	685	762	789	790	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319	95333	95339		101464	Wild- / Impftyp
31	1148/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
32	1167/04	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	n.a.	Ø
33	1170/04	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	Wildtyp	Ø
34	1194/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
35	1213/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
36	1219/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
37	1346/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
38	2038/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
39	408/05	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
40	549/05	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
41	550/05	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
42	647/05	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
43	706/05	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	Wildtyp	Ø
44	707/05	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
45	768/05	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
46	954/05	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	n.a.	Ø
47	955/05	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	Wildtyp	Ø
48	1002/05	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	Wildtyp	Ø
49	1152/05	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
50	16/06	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	Wildtyp	Ø
51	17/06	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	n.a.	Ø

Fortsetzung Tab. 30

		ORF	1						21							37	50	54							60	62	Virus- anzucht in HELF			
Lfd. Nr.	Labor- nummer	Position / Genotyp	626	685	762	789	790	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319	95333	95339		101464	Wild- / Impftyp	
52	18/06	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	n.a.	Ø	
53	19/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø	
54	60/06	A4	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	C	G	T	T	C	C	A	n.a.	Ø	
55	89/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø	
56	278/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø	
57	386/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø	
58	507/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø	
59	508/06	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø	
60	509/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø	
61	599/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø	
62	710/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø	
63	1058/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø	
64	1730/06	A3	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	T	C	A	Wildtyp	Ø	
65	1819/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø	
66	1820/06	A/B/C?	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	T	G	C	T	T	C	A	n.a.	Ø	
67	2253/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø	
68	2255/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø	
69	2277/06	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø	
70	2394/06	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (3. Passage)
71	151/07	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø	

Fortsetzung Tab. 30

		ORF	1						21						37	50	54						60	62	Virus- anzucht in HELF				
Lfd. Nr.	Labor- nummer	Position / Genotyp	626	685	762	789	790	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319		95333	95339	101464	Wild- / Impftyp
72	298/07	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (3. Passage)
73	405/07	B4	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	G	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (3. Passage)
74	445/07	A5	A	G	G	C	C	C	G	G	A	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	T	C	A	Wildtyp	+ (3. Passage)
75	446/07	A5	A	G	G	C	C	C	G	G	A	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	T	C	A	Wildtyp	+(3. Passage)
76	500/07	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (3. Passage)
Inkomplett charakterisierte Patientenstämme Varizellen																													
77	535/07	B/C ?							G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
78	542/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
79	1177/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
80	2099/04	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C		n.a.	Ø
81	259/06	A1	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	T	T	C	C		n.a.	Ø
82	978/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
83	1057/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
84	1075/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
85	1177/06	B5	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	C	G	T	T	T	C		Wildtyp	Ø
86	1179/06	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
87	1264/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
88	1265/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø

Fortsetzung Tab. 30

		ORF	1						21							37		50	54						60	62	Virus- anzucht in HELF		
Lfd. Nr.	Labor- nummer	Position / Genotyp	626	685	762	789	790	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319	95333	95339		101464	Wild- / Impftyp
89	1266/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	+ (3. Passage)
90	1406/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
91	1407/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
92	1433/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
93	1565/06	B3	A	G	G	T	T	T	G	T	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
94	1566/06	A3	A	G	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	C	G	T	T	T	C	A	Wildtyp	Ø
95	2254/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C		Wildtyp	Ø
96	2256/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T			T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø

Wildtyp: Analyse durch Restriktionsenzymverdau des ORF 62, Wildtyp bestätigt

+: Anzucht in HELF erfolgreich (Zahl der verwendeten Zellkulturpassage)

Ø: Anzucht auf HELF nicht erfolgreich

n.a. : nicht analysiert

8 Anhang

Tab. 31 : Übersicht über die genetischen Polymorphismen der einbezogenen VZV-Stämme von Patienten mit Zoster

Nukleotide, die dem Referenzstamm *Dumas* entsprechen, sind **grün** unterlegt. Nukleotide, die bei *pOka* zu finden sind, werden **blau** dargestellt. **Rot** sind solche Substitutionen unterlegt, die weder in den DNA-Sequenzen von *pOka* noch in denen von *Dumas* zu finden sind. **Heller** Untergrund bedeutet, dass die Nukleotide mit beiden Referenzstämmen übereinstimmen. **Grau** markierte Bereiche konnten nicht sequenziert und **schwarz** markierte Bereiche nicht amplifiziert werden.

		ORF	1						21							37	50	54							60	62	Virus- anzucht in HELF		
Lfd. Nr.	Labor- nummer	Position / Genotyp	626	685	762	789	790	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319	95333	95339		101464	Wild- / Impftyp
Referenzstämme																													
		Dumas	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	T	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C		
		pOka	A	A	G	C	C	C	G	G	G	A	C	C	C	T	G	C	T	T	C	G	C	T	T	C	C		
Komplett charakterisierte Patientenstämme – Zoster																													
1	243/00	C6	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (6. Passage)
2	375/00	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (3. Passage)
3	665/00	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (7. Passage)
4	914/00	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (7. Passage)
5	596/02	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (2. Passage)
6	81/03	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
7	419/03	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
8	710/03	C6	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
9	859/03	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
10	921/03	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø

Fortsetzung Tab. 31

		ORF	1						21						37	50	54						60	62	Virus- anzucht in HELF				
Lfd. Nr.	Labor- nummer	Position / Genotyp	626	685	762	789	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319	95333		95339	101464	Wild- / Impftyp	
11	1122/03	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
12	1234/03	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
13	1466/03	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
14	1715/03	B2	A	G	G	T	T	T	A	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
15	1801/03	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
16	1952/03	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
17	2488/03	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
18	2521/03	C2	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	T	C	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
19	2526/03	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
20	12/04	B1	A	G	A	T	T	T	G	G	G	C	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	G	T	C	C	Wildtyp	Ø
21	517/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
22	577/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
23	647/04	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
24	1308/04	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
25	1379/04	C6	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	T	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
26	1571/06	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (4. Passage)
27	52/07	B6	G	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (2. Passage)
28	391/07	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	+ (3. Passage)
29	431/07	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C	C	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	+ (3. Passage)
30	688/07	B	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø

Fortsetzung Tab. 31

		ORF	1						21						37	50	54						60	62	Virus- anzucht in HELF				
Lfd. Nr.	Labor- nummer	Position / Genotyp	626	685	762	789	790	791	33540	33563	33646	33654	33722	33725	33728	33927	66288	66350	87841	95226	95241	95262	95300	95319		95333	95339	101464	Wild- / Impftyp
Inkomplett charakterisierte Patientenstämme – Zoster																													
31	126/03	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C		T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
32	578/03	B															A	C	T	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø
33	1881/03	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T	G	C		T	T	G	C	T	T	C	C	Wildtyp	Ø
34	2560/03	C	A	G	G	T	T	T	G	G	G	A	C	T	T	T			C	T	T	G	C	T	T	C	C	n.a.	Ø

Wildtyp: Analyse durch Restriktionsenzymverdau des ORF 62, Wildtyp bestätigt

+: Anzucht in HELF erfolgreich (Zahl der verwendeten Zellkulturpassage)

Ø: Anzucht auf HELF nicht erfolgreich

n.a : nicht analysiert

8.2 Statistische Berechnungen

- Verteilung der VZV-Stämme des Genotyps C

Nullhypothese: Die Verteilung des Genotyps C unterscheidet sich nicht bei Zoster und Varizellen.

Alternativhypothese : Bei Zoster-Patienten gibt es mehr VZV-Stämme vom Genotyp C.

	Genotyp C-Stämme	Stämme anderer Genotypen	Summe
Varizellen	20	74	94
Zoster	17	17	34

$$\text{Prüfgröße } w = \{(17 \cdot 24 - 20 \cdot 17) \cdot \sqrt{128}\} / \{\sqrt{(34 \cdot 94 \cdot 37 \cdot 91)}\} = 3,0 \quad p = 0,01$$

Die Nullhypothese ist zu verwerfen. Die Alternativhypothese ist auf einem Signifikanzniveau von $p = 0,01$ anzunehmen. VZV-Stämme des Genotyps C kommen signifikant häufiger bei Zoster-Patienten vor.

- Verteilung der VZV-Stämme des Genotyps B

Nullhypothese: Die Verteilung des Genotyps B unterscheidet sich nicht bei Zoster und Varizellen.

Alternativhypothese : Bei Zoster-Patienten gibt es mehr VZV-Stämme vom Genotyp B als bei Varizellen-Patienten.

	Genotyp B-Stämme	Stämme anderer Genotypen	Summe
Varizellen	54	40	94
Zoster	17	17	34

$$\text{Prüfgröße } w = \{(54 \cdot 17 - 40 \cdot 17) \cdot \sqrt{128}\} / \{\sqrt{(94 \cdot 34 \cdot 71 \cdot 57)}\} = 0,7 \quad p = 0,5$$

Bezüglich der VZV-Stämme des Genotyps B gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Varizellen und Zoster.

- **Verteilung der VZV-Stämme des Genotyps A**

Nullhypothese: Die Verteilung des Genotyps A unterscheidet sich nicht bei Zoster und Varizellen.

Alternativhypothese : Bei Varizellen-Patienten gibt es mehr VZV-Stämme vom Genotyp A als bei Zoster-Patienten.

	Genotyp A-Stämme	Stämme anderer Genotypen	Summe
Varizellen	20	74	94
Zoster	0	34	34

Prüfgröße $w = \frac{(20 \cdot 34 - 74 \cdot 0) \cdot \sqrt{128}}{\sqrt{(34 \cdot 94 \cdot 20 \cdot 108)}} = 2,7$ $p = 0,01$

Die Nullhypothese ist zu verwerfen. Die Alternativhypothese ist auf einem Signifikanzniveau von $p = 0,01$ anzunehmen. VZV-Stämme des Genotyps A kommen signifikant häufiger bei Varizellen-Patienten vor.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name :	Reinhard Hild
Geburtsdatum :	22.09.1982 in Erfurt
Familienstand :	ledig
Eltern :	Dipl.-Ing. Wolfgang Hild Dipl.-Med. Barbara Rosemarie Hild, geborene Brendel

Schulbildung

1989-1993	Grundschule in Erfurt
1993-2001	Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums mit mathematisch-naturwissenschaftlichem Spezialschulteil in Erfurt mit Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

2001-2002	Zivildienst bei „Hilfe für das autistische Kind“ e.V.
-----------	---

Hochschulbildung

Seit 2002	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abschluß voraussichtlich im Dezember 2009
Seit 2006	Arbeiten zur Promotion am Instiut für Virologie und Antivirale Therapie

Jena, im Oktober 2008

8.4 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. habil. P. Wutzler danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena den experimentellen Teil meiner Arbeit durchzuführen zu können.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Professor Dr. med. habil. A. Sauerbrei für das zur Verfügung gestellte Thema, die fachliche Beratung, die Auswahl der Materialien und vor allem für die Unterstützung beim Abfassen der Dissertationsschrift.

Außerdem danke ich Herrn Dr. U. Eichhorn für die Unterstützung bei der Durchführung der PCR, Herrn Dr. rer. nat. E. Birch-Hirschfeld für die Herstellung der Oligonukleotid-Primer und Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. R. Zell für die Hilfestellung bei der Auswertung der Sequenzierdaten.

Frau M. Alexi, Frau M. Müller und Frau A. Philipps gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, dass sie mich bei allen Sorgen und Problemen unterstützten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Reinhard Hild,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben : Prof. Dr. med. A. Sauerbrei, PD Dr. R. Zell, Dr. med. U. Eichhorn, Dr. rer. nat. E. Birch-Hirschfeld, Anja Philipps, Monika Alexi und Martina Müller,

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, im Oktober 2008

Reinhard Hild